

(19)日本国特許庁 (J P)

(12) 公表特許公報 (A)

(11)特許出願公表番号

特表平6-502533

第1部門第1区分

(43)公表日 平成6年(1994)3月24日

(51)Int.Cl. <sup>5</sup> C 12 N 15/87 A 01 H 5/00 C 12 N 5/10	識別記号 Z NA Z NA A 8502-2B	府内整理番号 F I
	8931-4B 9281-4B	C 12 N 15/ 00 5/ 00
		審査請求 未請求 予備審査請求 有 (全 28 頁)

(21)出願番号 特願平4-500303  
(86) (22)出願日 平成3年(1991)11月21日  
(85)翻訳文提出日 平成5年(1993)5月24日  
(86)国際出願番号 PCT/EP91/02198  
(87)国際公開番号 WO92/09696  
(87)国際公開日 平成4年(1992)6月11日  
(31)優先権主張番号 90403332, 1  
(32)優先日 1990年11月23日  
(33)優先権主張国 欧州特許機構 (E P)  
(31)優先権主張番号 91401888, 2  
(32)優先日 1991年7月8日  
(33)優先権主張国 欧州特許機構 (E P)

(71)出願人 プラント・ジエネティツク・システムズ・エヌ・ペー  
ベルギー国、1040・ブリュッセル、コロネル・ブルフストラート・106  
(72)発明者 ダリュアン, カトリーン  
ベルギー国、9030・マリアケルケ、ホーリー・ランド・48  
(72)発明者 ゲーベル, エルケ  
ベルギー国、9000・ゲント、ヨゼフ・クル  
イスケンシユトラート・9  
(74)代理人 弁理士 川口 義雄 (外2名)

最終頁に続く

(54)【発明の名称】 単子葉植物の形質転換方法

(57)【要約】

緻密な胚形成カルスを形成することが可能な植物の無傷組織又は緻密な胚形成カルスそれ自体の細胞を損傷及び/又は分解することにより単子葉植物、特に穀類を形質転換する新規方法。

特表平6-502533 (2)

請求の範囲

1. 単子葉植物、特にイネ科植物、特定的にはトウモロコシ、コムギ、イネ、エンバク、オオムギ、モロコシ、ライムギ及びアワのような穀類植物、より特定的にはトウモロコシをDNA、ゲノム特に核ゲノムで形質転換するための方法であつて、a) 繁密な胚形成カルスを形成することが可能な前記植物の無傷組織又は前記植物の前記無傷組織から得られた繩密な胚形成カルス、特にその胚形成セクターを損傷及び／又は分解させ、i) 前記DNAの取り込み、ii) 前記植物ゲノムにおける前記DNAの組込み的形質転換及びiii) 前記細胞からの前記植物の再生に関して前記無傷組織又はカルスの細胞をコンピテントにする段階と、b) 前記コンピテント細胞を前記DNAで形質転換する段階と、次にc) 形質転換された前記コンピテント細胞から正常表現型稔性成熟植物のような正常表現型植物として前記植物を再生させる段階とを含む方法。
2. 最大寸法0.1～5mm、好ましくは1～2.5mm、特に1.25～1.75mmに切断することにより前記無傷組織を損傷させ、こうして生成された前記コンピテント細胞を形質転換することを特徴とする請求項1に記載の方

法。

3. 前記無傷組織を切断することにより損傷させた後、酵素で処理することにより分解し、好ましくは前記無傷組織の細胞壁に穴を開け、次にこうして生成された前記コンピテント細胞を形質転換することを特徴とする請求項1又は2に記載の方法。
4. 前記植物がトウモロコシであり、無傷未成熟トウモロコシ胚を酵素で処理することにより分解し、好ましくは前記胚の細胞壁に穴を開け、次にこうして生成された前記コンピテント細胞を形質転換することを特徴とする請求項1に記載の方法。
5. 前記カルスを最大長0.5～2.5mm、特に1～2mm、特定的には1.25～1.75mm、及び好ましくは最小長約0.1mmに切断することにより損傷させ、次いでこうして生成された前記コンピテント細胞を形質転換することを特徴とする請求項1に記載の方法。
6. 前記カルスを切断することにより損傷させた後、酵素で処理することにより分解し、好ましくは前記カルスの細胞壁に穴を開け、次いでこうして生成された前記コンピテント細胞を形質転換することを特徴とする請求項1又は5

に記載の方法。

7. 前記カルスを酵素で処理することにより分解して前記カルスの細胞壁に穴を開け、次いでこうして生成された前記コンピテント細胞を形質転換することを特徴とする請求項1に記載の方法。
8. 前記コンピテント細胞を直接遺伝子移入、特にエレクトロポレーションにより形質転換することを特徴とする請求項1から7のいずれか一項に記載の方法。
9. 植物中で発現可能なDNA、特にキメラ遺伝子で組み的に形質転換されたゲノム、特に核ゲノムを有するイネ科植物、特定的には穀類、より特定的にはトウモロコシ又はイネであつて、Dattaら(1990) Bio/Techology 8:736、Shimamotoら(1989) Nature 338:274、Gordon-Kammら(1990) The Plant Cell 2:603及びFrommら(1990) Bio/Techology 8:833により記載されているような従来の培養条件下においては、1) 前記DNAの取り込み、2) 前記植物ゲノムへの前記DNAの組込み的形質転換及び3) 前記DNAで形質転換された正常表現

型稔性植物としての前記植物の再生に関してコンピテントな前記植物の胚形成懸濁液培養物又はプロトプラストを得ることが実質的に不可能であることを特徴とする前記植物。

10. 特定系統の植物であつて、特に該系統の未形質転換プロトプラスト10000当たり約500以下、特に約100以下、特定的には約10以下、より特定的には約1以下しか正常表現型植物を再生できない場合に、前記培養条件下では該系統の形質転換胚形成懸濁液培養物又は形質転換プロトプラストから該系統の正常表現型稔性植物のような正常表現型植物として植物を再生することが実質的に不可能であることを特徴とする請求項9に記載の植物。
11. 請求項1から8のいずれか一項に記載の方法により作出される形質転換植物、特に単子葉植物、特定的にはイネ科植物、より特定的にはトウモロコシ又はイネのような穀類。

12. タイプIカルスを形成する能力を有するが、Gordon-Kammら(1990) The Plant Cell 2:603及びFrommら(1990) Bio/Techology 8:833により記載されている培養条件下では、10%以上、特に1%以上、特定

特表平6-502533 (3)

18. 請求項17に記載の形質転換単子葉植物の細胞又は複数の該細胞から本質的に構成される培養物。

的には0.1%以上、より特定的には0.01%以上の頻度でのタイプIIカルスを形成する能力をもたないことを特徴とする請求項9から11のいずれか一項に記載のトウモロコシ植物。

13. 前記DNAで組込み的に形質転換された請求項9から12のいずれか一項に記載の植物の細胞又は複数の該細胞から本質的に構成される培養物。

14. 請求項9から12のいずれか一項に記載の形質転換植物の種子。

15. ハイブリッド植物の作出手段のような授粉植物であることを特徴とする請求項9から12のいずれか一項に記載の植物。

16. 請求項15に記載の授粉植物と別の近交系植物とを交配することにより得られるハイブリッド。

17. タンパク質が発現される植物細胞を死滅又は不能にすることが可能な該タンパク質をコードし且つタペート特異的PTA29プロモーターの制御下にあるコーディング配列で形質転換された雄性不稔性単子葉植物、好ましくはイネ科植物、特にトウモロコシ植物、特定的には請求項12に記載のトウモロコシ植物、又は雄性不稔性植物の種子。

明細書  
単子葉植物の形質転換方法

本発明は、単子葉植物全般、特にイネ科植物、特定的にはトウモロコシ及び他の主要穀類の迅速且つ効率的な形質転換方法に係る。本発明は特に、トランスジェニック単子葉植物を得るために、緻密な胚形成カルスを形成することが可能な無傷組織又はこのような組織から得られる緻密な胚形成カルスの使用に係る。

本発明は更に、本発明の形質転換方法により得られる新規トランスジェニックイネ科植物、特に穀類に係る。

発明の背景

近年、植物の遺伝子操作の可能性はめざましく拡大している。多數のトランスジェニック双子葉植物種が得られた。しかしながら、多くの植物種、特に単子葉類、特定的にはトウモロコシ、コムギ及びイネのような経済的に重要な種を含むイネ科に属する植物は、安定的な遺伝子形質転換が非常に困難であるとされている。

問題は、a) 単子葉植物細胞をDNAで組込み的に形質転換（即ち単子葉植物細胞の核ゲノムにDNAを安定的に挿入）する点、及びb) 正常表現型發性成体単子葉植物のような正常表現型単子葉植物を形質転換細胞からの再生す

る点の両方にある。このような問題は主に1) DNA取り込み、2) 取り込まれたDNAによる組込み的形質転換及び3) 形質転換細胞から正常表現型単子葉植物を再生するという点に関してコンピテントな単子葉細胞が得られないことに起因すると示されている (Potrykus (1990) Bio/Technology 9: 535)。一般に、(ポリエチレンギリコール処理及び/又はエレクトロポレーションを使用して)プロトプラストに遺伝子を直接移入すると、成功の可能性が最も高いと考えられている。このような直接遺伝子移入方法で使用されるプロトプラストは、ほとんどの場合は胚形成細胞懸濁液培養物から得られる (Lazzeri及びLörrz (1988) Advances in Cell Culture, Vol. 6, Academic press, p. 291; Ozias-Akins及びLörrz (1984) Trends in Biotechnology 2: 119)。しかしながら、ほとんどの遺伝子型ではプロトプラストから正常表現型植物を再生し難いという事実により、このような方法の成功は制限されている。

最近になって特定の系統のイネ (Shimomotoら

特表平6-502533 (4)

(1989) Nature 338: 274; Dat taら (1990) Bio/Technology 8: 736; 及び Hayashimotoら (1990) Plant Physiol. 93: 857) 及びトウモロコシ (Gordon-Kammら (1990) Bio/Technology 2: 603; Pro mmら (1990) Bio/Technology 8: 833; Gouldら (1991) Plant Physiology 95: 426; 並びに PCT 公開明細書 WO 91/02071 及び WO 89/12102) を形質転換し、これらの系統から正常表現型植物を再生するのに成功したことが報告された。しかしながら、これらの形質転換及び再生方法を単子葉類全般、特にイネ科植物、より特定的には穀類に適用できるかどうかはこのような報告からは明らかでない。

発明の要約

本発明は単子葉植物、特に主要穀類（例えばトウモロコシ、コムギ、イネ、ライムギ等）のようなイネ科植物のゲノムを効率的且つ再現可能に形質転換するための新規方法を提供する。この方法は、a) 繁密な胚形成カルスを形成

することができる単子葉植物の無傷組織又はb) このような無傷組織から得られる繩密な胚形成カルス、特にその胚形成セクターのいずれか一方の細胞をDNAで形質転換することからなり、このような細胞は1) DNAの取り込み、2) DNAによる植物ゲノム、好ましくはその核ゲノムの組込み形質転換及び3) これらのゲノムの形質転換後に細胞から正常表現型植物（例えば正常表現型稔性成体植物）を再生する点に関してコンピテントである。このようなコンピテント細胞は好ましくは植物の無傷組織又は繩密な胚形成カルスを損傷及び／又は分解することにより得られ、例えばa) 無傷組織及びその細胞又はc) このような無傷組織から得られる繩密な胚形成カルス及びその細胞を切断し、及び／又はb) 無傷組織又は繩密な胚形成カルスの性質に依存して、無傷組織又は繩密な胚形成カルスを酵素で処理し、無傷組織又は繩密な胚形成カルスの細胞壁を分解することにより得られる。

こうして損傷及び／又は分解され、本発明のコンピテント細胞を含む無傷組織又は繩密な胚形成カルスは、好ましくはエレクトロポレーションのような直接遺伝子移入により1個以上のDNAフラグメント（例えば外来DNAフラ

グメント）、好ましくは線状DNAフラグメントで形質転換することができる。好ましくは、DNAフラグメントの少なくとも1個は、形質転換植物細胞の選択可能又はスクリーン可能なマーカー、好ましくは選択可能なマーカーとして機能し得る遺伝子を含む。このようなマーカーDNAフラグメントは別の着目遺伝子と同一のDNAフラグメント又は別のDNAフラグメント上に配置され得る。

形質転換細胞は、従来通りに選択的培地で好ましくは長時間培養することにより非形質転換細胞から分離することができ、こうして選択された形質転換細胞は、そのゲノム、特に核ゲノムに安定的に組み込まれた着目遺伝子を有する正常表現型植物（例えば成熟植物）に従来通りに再生され得る。

本発明は更に、1個以上のDNAフラグメントで安定的に形質転換されたゲノムを有する単子葉植物、特にイネ科植物、特に穀類植物の新規コンピテント細胞；このような形質転換細胞から構成される細胞培養物；このような形質転換細胞から再生された正常表現型植物（例えば正常表現型稔性植物）；及びこのような形質転換植物の種子を提供する。このような形質転換細胞、細胞培養物、植物及び種

子としては、タンパク質が発現される植物細胞を死滅又は不能にすることが可能なタンパク質をコードし且つタベート特異的PTA 29プロモーターの制御下にあり、従って植物を雄性不稔性にする遺伝子を含むDNAフラグメントで形質転換されたこのような形質転換細胞、細胞培養物、植物及び種子を挙げることができる。本発明の形質転換イネ科植物、特に形質転換トウモロコシ及びイネは、特にこのような植物系統の未形質転換プロトプラスト10000あたり、約500以下、特に約100以下、特定的には約10以下、より特定的には約1以下しか正常表現型植物を再生することができない場合、正常表現型植物のような形質転換植物を再生させることができることが従来技術では事実上不可能であるような植物系統、形質転換胚形成懸濁液培養物又は形質転換プロトプラストに由来することを特徴とする。

図面の簡単な説明

図1：未成熟接合体胚のエレクトロポレーションにより得られる5層のトウモロコシ形質転換株の実施例2のNpt I 1 ゲルアッセイ。

図2：配列番号2に示す配列をプローブとして使用した実施例1のトウモロコシ形質転換株（H 99-M 148-1）

特表平6-502533(5)

の1種のゲノムDNAの実施例2のサンプルロット。標準フラグメントの長さを表示する。起点は0により表示する。

レーン 1 : 入ファージのPst I消化DNA + Hind III消化pTTM1 (陽性対照-プローブは2824 bp pTTM1フラグメントにハイブリダイズする)

2 : Bgl II消化ゲノムDNA

3 : Eco RI消化ゲノムDNA

4 : Eco RV消化ゲノムDNA

5 : Hind III消化ゲノムDNA

6 : Bam HI消化ゲノムDNA

7 : Pvu I消化ゲノムDNA

8 : Pvu II消化ゲノムDNA

9 : Pst I消化ゲノムDNA

10 : 未形質転換H99植物のEco RI消化植物ゲノムDNA (陰性対照)

図3：未成熟接合体胚に由来する緻密な胚形成カルスフラグメントのエレクトロポレーションにより得られた7倍の形質転換株の実施例4のNpt IIゲルアッセイ。

図4：配列番号2に示す配列をプローブとして使用した実

施例3のトウモロコシ形質転換株 (Pa91-M146-2) の1種のゲノムDNAの実施例4のサンプルロット。標準フラグメントの長さを表示する。起点は0により表示する。

レーン 1 : 入ファージのPst I消化DNA + Hind III消化pTTM1 (陽性対照-プローブは2824 bp pTTM1フラグメントにハイブリダイズする)

2 : Bgl II消化ゲノムDNA

3 : Eco RI消化ゲノムDNA

4 : Eco RV消化ゲノムDNA

5 : Hind III消化ゲノムDNA

6 : Bam HI消化ゲノムDNA

7 : Pvu I消化ゲノムDNA

8 : Pvu II消化ゲノムDNA

9 : Pst I消化ゲノムDNA

10 : Eco RI消化植物ゲノムDNA (陰性対照)

配列表

配列番号1 : pDE108の配列。

配列番号2 : サザンハイブリダイゼーションでキメラ<sup>re</sup>遺伝子を検出するため使用されるプローブの配列。

配列番号3 : プラスミドpVE107及びpVE108の構造に使用され且つタバコのTA29遺伝子からのプロモーター及びバルナーゼ(barnase)遺伝子を含むプラスミドpTTM8のDNAフラグメントの配列。

配列番号4 : pDE110の配列。

発明の詳細な説明

単子葉類において、胚形成カルスは2種の異なる周知の型をとり得る (Vasili (1988) Bio/Technology 6:397; Armstrong及びGreen (1988) Crop Sci. 28: 363)。胚形成カルスの一方の型は、緻密及び/又は結節状と説明すると最適であり、しばしば有機化しているとみなされ得る。本明細書中で「緻密な胚形成カルス」と呼称するこのようなカルスは本発明に従って使用される。他方の一般により発生頻度の低い胚形成カルスの型は、軟弱で碎けやすく、胚形成能が高いと説明すると最適であり、本明細書中で「碎けやすい胚形成カルス」と呼称するこのようなカルスは、一般に緻密な胚形成カルスよりも迅速に

増殖する。どちらの型のカルスからも正常表現型植物を再生することができ、どちらの型のカルスでも種々の発生段階に休眠胚が存在する。2種のカルスの外観及び最終形態は種々の单子葉種、特に種々の穀類種で異なり得る。しかししながら、2種のカルスは種々の单子葉種の組織培養物を形成及び操作する当業者により容易に区別することができる。

トウモロコシにおいて、緻密な胚形成カルス及び碎けやすい胚形成カルスは夫々タイプIカルス及びタイプIIカルスとしてのほうがよく知られている。タイプI及びタイプIIトウモロコシカルスの構造及び特性の種々の顯著な特徴は、Armstrong及びPhillips (1988) Crop Sci. 28: 363; Springerら (1979) Protoplasma 101: 269; Fransz (1988) "Cytodifferentiation during callus initiation and somatic embryogenesis in Zea mays L.", Ph.D. Thesis, University of Wageningen, The Ne

特表平6-502533 (6)

therlands; Ozias-Akinsら (1982) *Protoplasma* 110: 95; Novakら (1983) *Maydica* 28: 381; Hoš (1983) *Protoplasma* 118: 169; Greenら (1975) *Crop Sci.* 15: 417; Freelingら (1976) *Maydica* 21: 97; Luら (1982) *Theor. Appl. Genet.* 62: 109; Vasilička (1985) *Protoplasma* 127: 1; Dunstanら (1978) *Protoplasma* 97: 251; Vasilička (1982) *Bot. Gaz.* 143: 454; Green (1983) In: *Basic biology of new developments in biotechnology*, Hollaenderら編, Plenum Press, New York, pp. 195-209; Vasilička (1984) *Am. J. Bot.* 71: 158; 及びKamoら (1985) *Bot. Gaz.* 146: 327のような文献に記載されている。

yozukaら (1988) *Theor. Appl. Genet.* 76: 887)、コムギ (Redwayら (1990) *Theor. Appl. Genet.* 76: 609; Redwayら (1990) *Plant Cell Reports* 8: 714) 及びオオムギのような穀類種の緻密な胚形成カルスと碎けやすい胚形成カルスとを区別することができる。

单子葉植物全般からでは、本発明の緻密な胚形成カルスは未成熟接合体胚、成熟種子、葉基部、茎、小胞子、幼花序等のような外植片の *in vitro* 培養により得られる。トウモロコシにおいてタイプIカルスは未成熟接合体胚から最も効率的に発生する。緻密な胚形成カルスは適切な外植片から誘導され得、十分に確立された方法に従って培地に維持される (Hodgesら (1986) *Bio/Technology* 4: 219)。カルス培養物の保存中には胚形成細胞を含むカルスの胚形成セクターのみを選択及びサブ培養するように注意すべきである。このような細胞は一般に小型で緊密に充填され、壁が薄く、細胞質が豊富であり、多数の小さい気孔、脂質液滴及び澱粉粒子を含む高軽基性細胞として特徴付けることができる (V

タイプロトウモロコシカルスはほぼ白色、青みがかった白色又は黄色がかった緻密な外観を呈しており、多くの場合は結節状表面を有しており、その結節状外観に示されるよう組織の有機化集合体として発生及び増殖する。該カルスは細胞結合及び分化の程度が高いことと、根、葉構造及び維管束要素のような種々の構造とにより特徴付けられる。体細胞胚が一般に誘導され得る。再生された苗条の胚源は必ずしも明白ではなく、外見からは体細胞胚形成及び器官形成の両方により形成されるよう見える。体細胞胚発生中に胚様体は融合して堅く白色のカルスを生じるか、又は二次体細胞胚に生長し得る。

タイプロトウモロコシカルスは主に軟弱で碎けやすく、白色又は青みがかった黄色の多少透明な外観を有しており、胚形成能が高い。該カルスは迅速に増殖し、維管束要素を含まない。タイプIIカルスは、胚様体をカルスに付着させる胚柄構造を有し得る多数の平滑で球状の胚様体を含むという点が碎けやすい非胚形成カルスと異なる。胚様体は十分に有機化された体細胞胚にも生長し得る。

2種のトウモロコシカルスタイプに見いだされるほぼ同一の顕著な特徴を使用して、他の单子葉種、特にイネ (K

asili (1988) 前出)、緻密な胚形成カルスを形成することが可能であるとして知られている組織を植物から取り出す最も簡便な方法は切解である。

本発明のコンピテント細胞は、注意な胚形成カルスを形成することが可能な無傷組織を植物から従来方法で切断することにより单子葉植物から直接得られる。このように損傷させた無傷組織の細胞はその後、安定的に形質転換することができる。しかしながら、このような損傷完全細胞をより小さいフラグメントに細分し、このような組織を更に損傷させ、形質転換のためのよりコンピテントな細胞を提供すると好適である。組織フラグメントの平均寸法は好みしくは長さ0.1~5mm、特に長さ1~2.5mm、より好みしくは長さ1.25~1.75mmである。この点で本発明の損傷無傷組織は、植物から切断された任意の組織片又は任意のそのフラグメント (例えば切断片) であり得る。即ち、「無傷組織」なる用語は組織培養段階を挟まずに天然に存在する植物部分から得られる单子葉植物細胞の集合体を意味するものと理解すべきである。

本発明のコンピテント細胞を生成するためには、植物から無傷組織を切断し、場合により更に破壊又は損傷させる

## 特表平6-502533 (7)

Cell Culture, A Practical Approach", R. A. Dixon 編, 第3章に記載されているような種々の酵素又は酵素溶液を使用することができる。

植物から得られる無傷組織が小さすぎて損傷（例えば切断）できない場合又は損傷させた無傷組織が小さすぎてそれ以上損傷（例えばより小片に細分）できない場合には、酵素処理を使用して付加的なコンピテント細胞を生成することができる。このような酵素処理は特に胚、特に生長中の種子から単離された未成熟接合体胚及び例えばトウモロコシの成熟（例えば乾燥）種子から単離された成熟接合体胚で本発明のコンピテント細胞を形成するために特に有用であり得る。胚は一般に種子から取り出すために切断されず、一般に緻密な胚形成カルスを生成する能力を損なわずに著しく小さいフラグメントに細分することはできない。未成熟胚は緻密な胚形成カルスの唯一の適切且つ信頼できるソースであるので、トウモロコシでは特に重要である。イネ及び他の単子葉類では成熟胚を使用することもできる。これに関連して、トウモロコシのような植物の場合、無傷組織（例えば未成熟トウモロコシ胚）は約0.5~2mm。

ようによく切断することにより無傷組織及びその個体細胞を機械的に破壊又は損傷させねば一般に十分である。この点で「機械的破壊」及び「損傷」なる用語は、細胞を暴露し、本発明に従ってDNAフラグメントを挿入するために、無傷組織の1個以上の細胞の細胞壁を著しく損傷させることを意味する。従って、本発明による「機械的破壊」又は「損傷」は細胞壁の切断に制限されず、細胞壁をこすったり、押し潰したり、又はたくなどの方法で細胞壁の1部分以上を物理的に除去するか又は細胞壁を1カ所以上不連続にする他の方法も包含する。

しかしながら、本発明に従って無傷組織を機械的に破壊又は損傷する操作に加えて又はこの操作の代わりに、特に無傷組織が比較的大きい場合には無傷組織を酵素又は酵素混合物で処理して植物細胞壁を分解してもよい。酵素処理は従来通りに実施することができる。好ましくは、酵素を無傷組織に加えてまず最初に細胞壁に穴を開ける。従って、酵素処理は組織を完全に破壊しないように比較的短時間（例えば無傷組織の性質及びコンシスティンシーに依存して1~10分間）行うと好適である。植物の種類に応じて Powell及びChapman (1985) "Plant

好ましくは0.5~1.5mmの最大長を有することが好ましいが、もっと短い0.5~1mmの長さも使用できる。

本発明によると、無傷組織を好ましくは例え約1.5分間以上、好ましくは約30分間~約5時間、特に2~3時間予備原形質分離にかけ、後述するエレクトロボレーション用緩衝液のような従来の高張液中に組織を置く。この予備原形質分離処理の目的は、無傷組織の細胞中でそのアロトプラスト、好ましくはその細胞壁の全部又は少なくとも一部をその細胞壁から分離することである。このような予備原形質分離は好ましくは無傷組織の損傷後で無傷組織の酵素処理前に実施される。無傷組織が既に酵素処理により分解されている場合には、その後の予備原形質分離を短時間だけ行い、上述のようにトウモロコシの未成熟胚の酵素処理後、このような原形質分離を全く行わないことが好適である。

本発明のコンピテント細胞は、本発明の無傷組織を in vitro 培養して、緻密な胚形成カルスを生成し、次にカルスをより小さいフラグメントに細分することによっても得られる。得られるカルスフラグメントは、カルスの胚形成セクター又は部分を完全又は少なくとも部分的に含

むべきである。カルスフラグメントは更に好ましくは、0.5~2.5mm、特に1~2mm、より特定的には1.25~1.75mmの平均最大長を有しており、好ましくは約0.1mmの最小長を有する。十分な量の緻密な胚形成カルスを得るためにには、組織外被片から得られるような一次カルスを少なくとも1ヶ月間増殖させ、このような一次カルスの胚形成セクターをこの期間に少なくとも1回サブ培養すると好適である。本発明のコンピテント細胞を生成するためには、緻密な胚形成カルスの胚形成セクター及びその細胞を例えれば切断により機械的に破壊又は損傷させねば十分であると考えられる。しかしながら、カルスを機械的に破壊する操作に加えて又はこの操作の代わりに、特に緻密な胚形成カルスフラグメントがまだ比較的大きい場合にはカルス細胞壁を酵素処理してカルス細胞壁を分解してもよい。この酵素処理は従来通りに実施することができる。酵素処理は好ましくはまず最初にカルスフラグメントの細胞の細胞壁に穴を開けるように実施され、従って、酵素処理は組織を完全に破壊しないように比較的短時間（例えばカルスフラグメントの性質及びコンシスティンシーに依存して1~10分間）行うと好適である。単子葉植物に依存し

特表平6-502533 (B)

て Powell 及び Chapman (1985) 前出に記載されているような種々の酵素又は酵素溶液を使用することができる。好ましくは、緻密な胚形成カルスフラグメントを同様に上述のように一定時間（例えば 2～3 時間）原形質分離する。

次に本発明のコンピテント単子葉植物細胞を形質転換させるために、上述のように得られた損傷及び／又は分解した無傷組織又は緻密な胚形成カルスフラグメント、特にその胚形成セクターを、着目遺伝子を含む 1 個以上の DNA フラグメントと接触させる。着目遺伝子の少なくとも 1 個が形質転換単子葉植物細胞中で選択可能なマーカーとして機能するように構成すると好適である。直接遺伝子移入、特にエレクトロポレーションは最適な形質転換効率を提供すると考えられる。しかしながら、ポリエチレンギリコール、DNA で被覆した微小放射体の挿込み（即ち例えば粒子線を使用するバイオリスティック (biolistic) ) な形質転換) 及び Agrobacterium で媒介される形質転換を使用する直接遺伝子移入のような他の既知の DNA 移入技術を使用してもよい。

本発明の植物形質転換方法を実施する際に使用される組

密な胚形成カルスは、碎けやすい胚形成カルスのいくつかの特徴を有する。この点で緻密な胚形成カルス又は碎けやすい胚形成カルスは緻密な胚形成カルスのいくつかの特徴と碎けやすい胚形成カルスのいくつかの特徴とを有する型のカルスに変異すること又は変異させることができる。その結果、このような中間型のカルス及びその胚形成部分は本発明に従って形質転換され得る。実際に中間型のカルス及び碎けやすい胚形成カルスで発生する体細胞胚は上述のように單離し、損傷及び／又は分解した後、形質転換することができる。即ち、本発明の方法を実施するにあたり、中間型カルス又は碎けやすい胚形成カルスから得られるこのような体細胞胚は、特に体細胞胚の細胞を形質転換するための手段としてエレクトロポレーションを使用する場合、生長中又は成熟した種子から得られる未成熟又は成熟接合体胚と等価であるとみなすことができる。

本発明によると、エレクトロポレーションは従来通りに実施され得る。この点で損傷及び／又は分解した無傷組織又はカルスフラグメント、特にその分裂又は胚形成セクション、より特定的にはその胚形成セクションを（例えば Dekeyserら (1990) The Plant Ce

II : 591 に記載されているように）エレクトロポレーション装置で使用するのに適したキュベットに移すことができる。好ましくは、エレクトロポレーション緩衝液 200 μl 当たり約 10～500 mg、特に約 50～200 mg、最適には約 100～150 mg の無傷組織又はカルスフラグメントをキュベットに移す。トウモロコシのような穀類の場合（特に酵素処理した未成熟無傷胚を使用するのが好適な場合）には、エレクトロポレーション緩衝液 200 μl 中に約 10～500 個、特に約 50～150 個、より特定的には約 75～125 個の胚をキュベットに移すことが好ましい。次に DNA をキュベットに加え、エレクトロポレーションを行う。好ましくは、エレクトロポレーションの前に DNA を無傷組織又はカルスフラグメントと共に（例えば約 1 時間）コインキュベートすると好適である。円形よりもむしろ線状で比較的小寸法、好ましくは約 20 kb 未満、特に 15 kb 未満、特定的には 10 kb 未満、より特定的には 6 kb 未満（例えば約 2～3 kb まで）の DNA で最も良い結果が得られると考えられる。この点で、本発明のコンピテント細胞を複数の着目遺伝子で形質転換するために異なる組成の複数の線状 DNA フラグメントを

使用することができる。好ましくは、無傷組織又はカルスフラグメントを含むキュベットに約 5～30 μg、特に約 10～25 μg、より特定的には約 20 μg の DNA を加える。特定のエレクトロポレーション条件に限定する必要はなく、例えば 150 mM NaCl 又は 80 mM KCl を含有するエレクトロポレーション緩衝液を使用して 900 μF キャパシタから 375 V/cm の電界強度でバルス放電することにより良好な結果が得られる（Dekeyserら (1990) 前出）。

（例えばエレクトロポレーションにより）形質転換が完了したら、形質転換した単子葉植物細胞を含む無傷組織又はカルスフラグメントを適切な培養培地、好ましくは選択培地（形質転換細胞が選択可能なマーカーを含む場合）に移す。この転移は形質転換できるだけ早く、好ましくは形質転換直後、特に形質転換後 1～3 日間以内に実施すべきである。好ましくは、選択可能なマーカーで形質転換された無傷組織又はカルスフラグメントを、従来の培養条件及び選択剤を補充した培養培地（例えば Vasil (1988) 前出の引用文献参照）を使用して培養する。選択剤の選択は、以下に記載するように無傷組織の細胞又はカルスフラ

特表平6-502533 (9)

グメントを形質転換するためにDNAフラグメント中で使用される選択可能なマークーに依存する。選択剤の濃度は、選択可能なマークーを含有するDNAフラグメントを細胞のゲノムに好ましくは完全に組み込んだ安定的形質転換株のみが生存し、単離できるように、形質転換細胞に非常に高い選択的压力を提供するように設定すべきである。このような形質転換無傷組織又はカルスフラグメントを非選択培地上で数日間培養することもできるが、選択培地にできるだけ早く移し、正常表現型植物を再生するために使用可能な形質転換した緻密な胚形成カルスのような形質転換形態形成カルスを十分量生成するように長期間（例えば6カ月間）、好ましくは少なくとも1カ月、特に2～3カ月間維持することが好ましい。更に、培地の高活性は例えば培地にマンニトールを補充することにより短期間（例えば2～3週間まで）維持すると好適である。

本発明によると、单子葉植物のゲノム、特に該ゲノムに任意のDNAフラグメントを組み込むことができる。一般に、DNAフラグメントは形質転換植物細胞において機能的であり且つこのような細胞及び細胞から再生される植物に付加的な特性を与える外来もしくは内在遺伝子又は他の

A配列はタンパク質のコーディング配列（又は標的配列が存在する場合には標的配列）の開始コドンで翻訳が開始するよう連続すべきである。

形質転換双子葉植物で遺伝子を発現させるために現在使用されている器官及び組織特異的な種々の構成プロモーターは本発明の形質転換单子葉類で使用するためにも適切であると考えられる。この点では着目タンパク質をコードするコーディング配列と、その上流（即ち5'）でコーディング配列の発現に適切な外来又は内在プロモーターとを含むキメラ遺伝子で特定の植物細胞を形質転換させることができる。適切な外来構成プロモーターは、異種遺伝子を構成的に発現させる（Odeillら（1983）*Nature* 313: 810）カリフラワーモザイクウイルス（CaMV）単離株CM1841（Gardnerら（1981）*Nucl. Acids. Res.* 9: 2871）及びCabbB-S（Franckら（1980）*Cel.*, 21: 285）（「35Sプロモーター」）；CaMV単離物CabbB-JI（Hull及びHowe II（1978）*Virology* 86: 482）から単離することができ且つその配列（35S3プロモー

DNA配列を含む。このために、DNAフラグメントは好みしくは次の作動的に連続するDNA配列：1) 植物細胞中でコーディング配列を発現させることができプロモーター配列（「プロモーター」）、2) 植物細胞内で特異的活性を有するタンパク質（「着目タンパク質」）をコードする配列（「コーディング配列」）、及び3) 適切な5'転写調節シグナルを含む1個以上のキメラ遺伝子を含む。タンパク質の必要な機能を得るために、シトソール、ミトコンドリア、クロロプラスト又は小胞体のような植物細胞の1個以上の特定の区画にタンパク質を標的することも必要であり得る。シトソールに標的するためには、上述のようなキメラ遺伝子をそのまま使用することができる。一方、他の区画に標的するためには、キメラ遺伝子のDNAフラグメント1) 及び2) の間に付加的な配列（「標的配列」）が存在することが必要である。必要に応じてキメラ遺伝子は更に転写及び／又は翻訳エンハンサーを含んでもよく、DNA配列のコドン使用を植物細胞における発現のために最適化することができる。

本発明のキメラ遺伝子は十分に確立された原理及び方法に従って構築することができる。この点では、種々のDN

ターの配列はヨーロッパ特許公開明細書（EP）第359617号に開示されている）及びトランスジェニック植物における高活性（Harpsaterら（1988）*Mol. Gen. Genet.* 212: 182）において35S3プロモーターと異なる関連プロモーター（「35S3プロモーター」）；並びにAgrobacterium（Velteneら（1984）*EMBO J.* 3: 2723）のT-DNAの夫々1'及び2'遺伝子を発現させ且つ損傷誘導プロモーターであるTR1'及びTR2'プロモーターを含む。器官特異的、組織特異的及び／又は誘導可能な適切な外来プロモーターも知られており（例えばKuhlemeierら（1987）*Ann. Rev. Plant Physiol.* 38: 221の引用文献参照）、例えば光合成組織中のみで活性な光誘導プロモーター（Krebbesら（1988）*Plant Mol. Biol.* 11: 745）であるArabidopsis thalianaの1.5-リブロース二リン酸カルボキシラーゼのサブユニット遺伝子（例えば1A遺伝子）のプロモーター（「ssu」プロモーター）；ヨーロッパ特許第344029号に開示されている特許

## 特表平6-502533 (10)

異的プロモーター；並びに例えば Arabidopsis thaliana の種子特異的プロモーター (Krebbbersら (1988) Plant Physiol. 87: 859) を挙げることができる。ヨーロッパ特許第344029号に記載されているように单子葉類を雄性不稔性にするように形質転換するために特に有用なプロモーターは、タベート特異的プロモーター PTA29, PTA26 及び PTA13、特にヨーロッパ特許第344029号のPTA29である。

同様に、形質転換した双子葉植物で使用される既知の 3' 転写調節配列及びポリアデニル化シグナルも本発明の形質転換单子葉類で使用できると考えられる。このような 3' 転写調節シグナルはコーディング配列の下流 (即ち 3') に提供され得る。この点では、キメラ遺伝子の発現を得るために適切な外来又は内在転写終結及びポリアデニル化シグナルのいずれかを含むキメラ遺伝子で特定の植物細胞を形質転換することができる。例えば、遺伝子 7 (Velt en 及び Schell (1985) Nucl. Acids Res. 13: 6998)、オクトビンシンターゼ遺伝子 (Gielensら (1983) EMBO J.

3: 835) 及び Agrobacterium tumefaciens Tiプラスミドの T-DNA 領域のノバリンシンターゼ遺伝子のような遺伝子の外側 3' 未翻訳末端を使用することができる。

形質転換した植物細胞中、好ましくはその細胞質中で発現可能なキメラ遺伝子を構築し、その後、その着目タンパク質を細胞のミトコンドリア、クロロプラスト及び／又は小胞体の内腔に転位させるために、適切な標的配列が知られている。このような標的配列の選択は限定的ではなく、遺伝子の発現産物を転位させる標的ペプチドをコードする外来又は内在標的配列を含むキメラ遺伝子で特定の植物細胞を形質転換することができる。「標的ペプチド」なる用語は、一般に真核細胞内でクロロプラストタンパク質、ミトコンドリアタンパク質、タンパク質のサブユニット、又は小胞体に転位したタンパク質と会合しており且つ細胞の核 DNA によりコードされる前駆物質タンパク質の一部として細胞中で產生されるポリペプチドフラグメントを意味する。標的ペプチドは核コードされたクロロプラストタンパク質、ミトコンドリアタンパク質又はサブユニットがクロロプラスト、ミトコンドリア又は小胞体の内腔に転位す

る過程に関与する。転位過程中に標的ペプチドはタンパク質又はサブユニットから分離又はタンパク分解により除去される。ヨーロッパ特許出願 (EPA) 第 85402596, 2 号及び 88402222, 9 号に概説されているようすに発現された着目タンパク質を形質転換植物細胞内で転位させ得る標的ペプチドを発現させるためには、キメラ遺伝子に標的配列を配置すればよい。クロロプラストに輸送するために適切な標的ペプチドは、酵素 1, 5-リブロース二リン酸カルボキシラーゼの小サブユニットのトランジットペプチド (Krebbbersら (1988) Plant Mol. Biol. 11: 745; EPA 85402596, 2) であるが、Watson (1984) Nucl. Acids Res. 12: 5145 及び Von Heijne ら (1991) Plant Mol. Biol. Rep. 9: 104 に記載されているような他のクロロプラストトランジットペプチドも使用できる。適切なミトコンドリア標的ペプチドは Schatz (1987) Eur. J. Biochem. 165: 1 及び Watson (1984) 前出に記載されているようなミトコンドリアトランジットペプチドである。着目タ

ンパク質を植物細胞の小胞体の内腔に転位させ得る適切な標的ペプチドは、例えば Von Heijne (1988) Biochem. Biophys. Acta 947: 307 及び Watson (1984) 前出に記載されているようなシグナルペプチドである。

トランスジェニック双子葉植物の作出に使用可能なコーディング配列は周知であり（例えば Weisinger ら (1988) Annual Rev. Genet. 22: 421 に記載されているコーディング配列を参照のこと）。このようなコーディング配列は本発明の形質転換单子葉植物で同様に良好に使用できると考えられる。この点ではコーディング配列は植物に対して外来でも内在的でもよく、例えば昆虫種に対して毒性であり、従って植物を昆虫の攻撃から保護し (EP 193259, EP 305275 及び EP 358556)； 植物をストレス条件から保護し (EP 359617)； 特定の除草剤に対する耐性を植物に与え (EP 242236)； コーディング配列が雄性又は雌性器官特異的プロモーターの制御下にあるときに、タンパク質が植物を夫々雄性雄性 (EP 344029) 又は雄性雌性 (EP 412006) にできるようにタンパク質

## 特表平6-502533 (11)

が発現される植物細胞を死滅又は不能にし； 植物又は選択された植物器官から抽出することができ、場合により経済的に重要なペプチド又はタンパク質源として使用できるように更に処理することができ (EP 319353) ; 又はタンパク質が発現される形質転換植物又はその器官を高栄養レベルの食品として動物又はヒトに使用できるよう栄養的に重要なアミノ酸が豊富であるタンパク質を例えばコードすることができる。

单子葉類を昆虫耐性にするように形質転換するために特に有用なコーディング配列は、殺虫性結晶タンパク質及びその殺虫性ポリペプチド毒素をコードする Bacillus thuringiensis (Bt) 株及びその細胞部分から単離した遺伝子である (参考のために H. Ite 及び Whiteley (1989) Microbiol. Rev. 53: 242 を参照)。殺虫 (例えばトウモロコシ、イネ、コムギ及びオオムギ) における昆虫駆除特に重要であると考えられる Bt 遺伝子としては、Helicoverpa 種 (例えば H. zea 及び H. armigera) の駆除用として Cry I Ab 遺伝子 (EP 193259) 及び Cry I Ac 遺伝子； トウモロコシにお

ける Ostrinia 種 (例えば O. nubilalis) の駆除用として Cry I Ab 遺伝子及び Cry I b 遺伝子 (EP 358557) ; トウモロコシ及びコムギにおける Agrotis 種の駆除用として Cry I Ac 遺伝子； 及びトウモロコシにおける Spodoptera 種 (例えば S. frugiperda) の駆除用として Cry ID 及び Cry IE 遺伝子 (EP 358557) などの遺伝子が挙げられる。トランスジェニック植物の組織でこのような遺伝子を十分に発現させるためには、PCT 出願 PC T / EP 91 / 00733 (PCT 公開 WO 91 / 16432) に記載されているように遺伝子を修飾すると好適である。

本発明の選択可能なマークーはキメラ遺伝子であり、該遺伝子のコーディング配列は、該遺伝子が発現される植物細胞に抗生物質及び／又は除草剤のような選択剤に対する耐性を与えるタンパク質をコードする。本発明のスクリーン可能なマークーはキメラ遺伝子であり、該遺伝子のコーディング配列は、該遺伝子が発現される植物細胞に異なる色のような異なる外観を与えるタンパク質をコードし、こうしてスクリーン可能なマークーで形質転換された植物を

手動的に分離できるようにする。本発明に従って单子葉植物を形質転換するための選択可能又はスクリーン可能なマークー、好ましくは選択可能なマークーの選択は非限定的であり、従来の選択可能なマークー及びスクリーン可能なマークー (例えば Weisingら (1988) 前出に記載されているようなマークー) を使用することができる。選択可能なマークーの適切なコーディング配列の例は、抗生物質カナマイシンに対する耐性を与える酵素ネオマイシンホスホトランスフェラーゼをコードする neo 遺伝子 (Beckら (1982) Gene 19: 327)； 抗生物質ハイグロマイシンに対する耐性を与える酵素ハイグロマイシンホスホトランスフェラーゼをコードする hyg 遺伝子 (Gritz 及び Davies (1983) Gene 25: 179)； 及び除草剤ホスフィノトリシン (phosphinotrichin) に対する耐性を与えるホスフィノトリシンアセチルトランスフェラーゼをコードする bar 遺伝子 (EP 242236) である。クロロブラスト代謝に作用する除草剤又は他の選択剤に対する耐性を与えるタンパク質をコードする選択可能なマークー遺伝子 (例えば bar 遺伝子) を使用する場合には、

マークー遺伝子は上記のようなクロロブラスト特異的配列を有するキメラ構造の一部であると好適である。スクリーン可能なマークーの適切なコーディング配列の例は、β-グルクロニダーゼをコードする gus 遺伝子 (Jeffersonら (1986) Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A. 83: 3901) 及びルシフェラーゼ遺伝子 (Owら (1986) Science 234: 856) である。

上述のように、選択剤の存在により提供される選択圧力は、選択可能なマークーを含む本発明の形質転換植物細胞の培養中にかなり高いことが好ましい。例えば、bar 遺伝子を選択可能マークーとして使用する場合には、カナマイシンを培地中に少なくとも約 100 ~ 200 mg/l、好ましくは少なくとも約 200 mg/l の濃度で使用すべきである。このような高い選択圧力は更に長期間 (例えば 2 ~ 4 ヶ月) 維持すべきである。しかしながら、特定の選択圧力及び期間に固定する必要はなく、選択圧力及びその期間は従来通りに選択できると考えられる。一方、bar 遺伝子を選択可能マークー遺伝子として使用する場合には、ホスフィノトリシン (PPT) を培地中に 0.5 ~ 50、

特表平6-502533 (12)

特に 2~20 mg/l の濃度で使用すると好ましい。

本発明の緻密な胚形成カルスの損傷及び／又は分解した無傷組織又は損傷及び／又は分解した胚形成セクターの形質転換細胞の培養で產生される形態形成カルス、好ましくは胚形成カルスの形態形成セクター、好ましくは胚形成セクターを次に從来方法（例えば Vasil (1988) 前出及び Lazzeri 及び Lazzar (1988) 前出の引用文献参照）で正常表現型（例えば成熟及び雌性）植物に再生することができる。こうして得られた再生植物はトランジェニックであり、株ダメノムに安定的に組み込まれた選択可能又はスクリーン可能なマーク、好ましくは選択可能なマークを少なくとも有する。次に例えばサザンブロッティング及び／又はポリメラーゼ鎖反応 (Sambrook (1990) Molecular Cloning: A Laboratory Manual, Cold Spring Harbor Laboratory) のような從来方法で他の着目遺伝子の存在及び発現を開べることができる。

本発明の目的では、本発明の形質転換及び再生手順により產生されるような正常表現型植物は、形質転換中に植物

のゲノムに導入される DNA フラグメントの発現により付加又は変化した特徴以外の如何なる表現型特徴においても同一系統の未形質転換植物と実質的に相異しない少なくとも 1 種の植物として理解されるべきである。当然のことながら、植物を形質転換するためのどの手順を使用した場合にも、種々の表現型を示す多數のトランジェニック植物が通常生成され、そのうちで一部のみが上記に定義したような正常表現型である。

本発明の方法は未成熟及び成熟接合体胚、葉基部、花序等のような種々の外植片から誘導される外植片の in vitro 培養中に緻密な胚形成カルスのような緻密な形態形成カルスが得られる全單子葉植物種に適用することができる。本発明の方法は経済的に重要なイネ科作物、特にトウモロコシ、コムギ、イネ、エンバク、オオムギ、モロコシ、ライムギ及びアワのような主要穀類の形質転換に特に有用である。本発明のトランジェニック植物は、農学的価値の高い新規系統及び／又は栽培変種植物を迅速且つ効率的に創製するために使用することができる。この点で、本発明によると、（参考資料として本明細書の一部に加える）EP 412006 に開示されているハイブリッド種子の作出用授粉植物、例えば雄性不稔性授粉植物として使用可能なトランジェニック植物を創製することができる。

本発明は、形質転換した形態形成カルス、好ましくは緻密な胚形成カルスの培養物を生成するために無傷組織又は緻密な胚形成カルスを使用して單子葉植物を形質転換するための迅速で効率的で且つ再現可能な方法を提供する。無傷組織も緻密な胚形成カルスも一般には安定的形質転換株

を得るために適切な出発物質として認められていない (Vasil (1990) Bio/Technology 8: 797) ので、これは驚くべき知見である。本発明に従って無傷組織又は緻密な胚形成カルスを使用すると、1) DNA 取り込み、2) 組込み的形質転換及び 3) 効率的で再現可能な單子葉植物再生に関してコンビテントな掛けやすい胚形成カルス、胚形成細胞懸濁液培養物及び／又はプロトプラストを使用することが必要であった既存の單子葉形質転換方法を著しく改善することができる。従来ではこのようなコンビテントの必要により、單子葉類の安定的形質転換は非常に特定の組織培養物特性を有する植物系統に限られていた。例えばトウモロコシでは、コンビテントな懸濁液培養物及び／又はプロトプラストを相当の頻度で得られる十分なタイプ II カルスを形成する（即ち 10% 以上、例えば 80% 以上までの頻度でタイプ II カルスを形成する）能力を有するのは、近交系 A188 のような特定の系統に限られていた。しかしながら、このようなトウモロコシ系統はいずれも農業的価値が低く、従って、適当な組織培養特性を形質転換可能な低価値系統から有用なトウモロコシ系統に移入するといった労力のかかる育種ア

特表平6-502533 (13)

ログラムを使用しなければ、経済的に価値のあるトウモロコシ系統を形質転換することはできなかった。

本発明の方法は比較的短時間の *in vitro* 培養しか必要としないので、従来方法よりも時間及び労力を著しく節約できる。組織培養時間が短いため、ソマクローナル変異の発生を少なくすることもできる。

本発明の方法は、核ゲノムに安定的に組み込まれた少なくとも1個の(外来)着目遺伝子で形質転換された新規な正常表現型(例えば稔性)トランスジェニック単子葉植物、特にイネ科植物、より特定的には穀類、最も特定的にはトウモロコシ及びイネを提供する。本発明の方法は、形質転換される植物の遺伝子型から独立しており、緻密な胚形成カルスがその組織の少なくとも1個から得られるような任意の植物の細胞を形質転換することが可能であると考えられる。従って、単子葉種の大部分及び各種内の実質的系統を形質転換することが可能になる。更に、緻密な胚形成組織を形成する能力を有するある系統から有さない別の系統に従来の育種プログラムによりこのような能力を伝達することができる。

形質転換した形態形成カルス、特に形質転換した緻密な

胚形成カルスから再生される本発明の新規トランスジェニック単子葉植物は、例えば Datta ら(1990) 前出、 Shimamoto ら(1989) 前出、 Hayashimoto ら(1990) 前出、 Gordon-Kamm ら(1990) 前出、及び Fromm ら(1990) 前出に記載されているような従来の培養条件を使用してこのような単子葉植物から胚形成懸濁液培養物及び/又はプロトプラストを得ることが実際に不可能であること又は、安定的に形質転換された後に正常表現型(例えば稔性)トランスジェニック植物として再生される十分な能力を有する胚形成懸濁液培地及び/又はプロトプラストを得ることが実際に不可能であることを特徴とする。この第2番目の特徴に関しては、1) 正常表現型植物に再生できる確率が高く、2) DNA取り込み及びこうして取り込まれたDNAの組込み形質転換に関してコンピテントである確率が高く、3) こうして形質転換された場合に正常表現型トランスジェニック植物に再生できる確率が高いこのような単子葉植物の胚形成懸濁液培養物又はプロトプラストを得ることは実際的でないと考えられる。

特に本発明は、例えば Shi ら(1990) Plant

Mol. Biol. Report. 8: 276, Datta ら(1990) Plant Sci. 67: 83 及び Datta ら(1990) Plant Cell Rep. 9: 253 に記載の手順に従って(取得可能な場合に)胚形成懸濁液培養物を一般に取得することができ、例えば Shi 及び Murai(1990) Plant Cell Rep. 9: 216 により記載されている手順に従って胚形成懸濁液培養物から(取得可能な場合に)プロトプラストを一般に取得できるようなイネ系統の新規トランスジェニックイネ植物を提供する。一方、例えば Shimamoto ら(1989) 前出、 Datta ら(1990) 前出及び Hayashimoto ら(1990) 前出に記載されているような従来の培養条件下では、このようなイネ系統の胚形成懸濁液培養物又はプロトプラストから正常表現型(例えば稔性)植物を再生することはできない。

本発明は更に、例えば Shillito ら(1989) Bio/Technology 7: 581, Prioli 及び Sandahl(1989) Bio/Tech nology 7: 589, Gordon-Kamm

ら(1990) 前出、並びに Fromm ら(1990) 前出により記載されている手順に従って(取得可能な場合に)胚形成懸濁液培養物を一般に取得することができ、例えば Shillito ら(1989) 前出並びに Prioli 及び Sandahl(1989) 前出により記載されている手順に従ってこのような胚形成懸濁液培養物から(取得可能な場合に)プロトプラストを一般に取得できるようなトウモロコシ系統の新規トランスジェニックトウモロコシ植物を提供する。一方、例えば Shillito ら(1989) 前出、 Prioli 及び Sandahl(1989) 前出、 Gordon-Kamm ら(1990) 前出並びに Fromm ら(1990) 前出により記載されているような従来の培養条件下では、このようなトウモロコシ系統の胚形成懸濁液培養物又はプロトプラストから正常表現型(例えば稔性)植物を再生することはできない。更に、このようなトウモロコシ系統は高頻度でタイプIカルスを形成する能力を有するが、10%以上の頻度、特に1%以上、より特定的には0.1%以上、更に特定的には0.01%以上の頻度でのタイプIIカルスを形成する能力をもたない。タイプIIトウモロコシカルスは、安定的に形

特表平6-502533 (14)

質転換できる胚形成懸濁液培養物及び再生可能なプロトプラストが適切に得られるトウモロコシカルス組織の唯一の型であり、従って、特定のトウモロコシ系統でタイプIIカルスを得られないことは、このようなトウモロコシ系統の形質転換カルスから正常表現型（例えば成熟）トランジエニックトウモロコシ植物を從来再生できなかったことを意味する。特定のトウモロコシ系統からタイプIIカルスを実際に得られるか否かは、Gordon-Kammら（1990）前出及びFrommら（1990）前出とその引用文献により記載されている一般手順により調べることができる。この検査によると、例えばトウモロコシ系の1000個の未成熟胚からカルス培養を開始することができ、3週間おきにサブクローニングすることにより培養を維持することができ、典型的なタイプIIカルスに最も近似する培養物のみを継代培養することができ、6ヶ月後にどの程度の頻度で均質なタイプIIカルスが得られるかを決定することができる。

より一般的には、単子葉種の特定の系統から再生可能なプロトプラストを実際に得られるか否かを決定するためには、以下に述べるような周知手順をとることができる。こ

れについては、任意の特定の単子葉類で從来手段により生成及び維持され得る胚形成懸濁液培養物から、再生可能なプロトプラストが効率的且つ確実に生成されると考えられる。胚形成懸濁液培養の程度及び品質は一般にその遺伝子型に依存し、一般に胚形成懸濁液培養物が植物を再生可能である場合には形質転換のために植物系統のプロトプラストを形成することしか価値がない。胚形成懸濁液培養物は一般に、細胞質に富んだ胚形成細胞の十分に分散した小群から構成され、カルス組織又は有機化分裂組織を含まず、27～32時間の細胞倍加時間を有しており、体細胞胚及び植物を形成することが可能であるという特徴を有する（Vassil (1988) Bio/Technology 6: 397）。単子葉種の特定の系統の胚形成懸濁液培養物が植物再生に適切であるか否かを決定するには、多數（即ち少なくとも100個）の細胞集合体を適切な再生培地におき、どの程度の割合の集合体が正常表現型稔性植物をもたらすかを決定すればよい。正常稔性植物が細胞集合体の50%以上から得られる場合には、一般にプロトプラスト生成を続行すべきであると判断される。一方、從来のプロトプラスト單離、培養及び植物再生技術を使用してア

ロトプラスト10000個当たり約500以下、特に約100以下、特定的には約10以下、より特定的には約1以下の正常表現型（例えば稔性）植物しか再生できない場合には、特定の単子葉系統は植物形質転換に適切な再生可能なプロトプラストを提供するために適切でないと判断することができる。

以下、実施例により本発明を説明する。特に指定しない限り組換DNAを操作するための全実験手順は、Sambrookら（1990） Molecular Cloning: A Laboratory Manual, Cold Spring Harbor Laboratoryに記載されている標準化手順により実施した。オリゴヌクレオチドはKramer及びPritz (1968) Methods in Enzymology 154: 350に要約されている一般規則に従って設計し、Beaucage及びCaruthers (1981) Tetrahedron Letters 22: 1859のホスホラミジト法によりApplied Biosystems 380A DNA合成器 (Applied Biosystems B.V., Maarsse, N

etherlands) で合成した。実施例で使用した以下の細菌株及びプラスミドはDeutsche Sammlung für Mikroorganismen und Zellkulturen (DSM), Münchener Weg 1B, Braunschweig, Germanyから入手可能である。

細菌株	プラスミド	DSM番号	寄託日
大腸菌WKB	pMc5-8	DSM 4567	1988年5月3日
大腸菌WKB	pMc5-8	DSM 4566	1988年5月3日

特表平6-502533 (15)

実施例1：DNAを接合体の未熟な胚にエレクトロポレーションすることによる選択可能なマーカー遺伝子を持つトウモロコシの形質転換

約0.5～1mmの接合体の未熟な胚を、2種類のトウモロコシの自家授粉系(Pa91及びH99)から生長させた種から単離した。新しく単離した胚を、酵素溶液Ⅱ[10%マンニトール及び5mM 2-[N-モルフォリノ]エタンスルホン酸(NES), pH5.8を含むCPM基(Powell & Chapman: 1985 "Plant Cell Culture, A Practical Approach", R.A.Dixon編., 第3章)中の0.3%macerozyme(Kinki Yakult, Nishinomiya, Japan)]で1～2分酵素処理した。この酵素溶液中で1～2分インキュベーションした後、胚を注意深く、N6gph溶液(6mMアスパラギン、12mM プロリン、1mg/lチアミン-ECI、0.5mg/lニコチン酸、100mg/lカゼイン水解物、100mg/lイノシトール、30g/l蔗糖及び54g/lマンニトールを補ったN6培地[Chuら(1975)Sci.Sin.Peking 18:659]のマクロ-及びミクロ-エレメント)で洗浄した。洗浄後、胚をトウモロコシエレクトロポレーション緩衝液、EPK-NaCl[150mM NaCl, 5mM CaCl<sub>2</sub>, 10mM HEPES(H-2-ヒドロキシエチルビペラジン-N'-2-エタンスルホン酸)及び0.425M マンニトール,pH7.2]中

でインキュベートした。200μl EPK-NaCl中の約100個の胚を、各キュベットに載置した。HindIIIで直線化したプラスミドDNA、pDE108約20μgを各キュベットに添加した。pDE108は、5399 bp プラスミドであり、その全配列はSeq.Id. No.1に記載されており、3558プロモーター(EP359817)の制御下でカナマイシン耐性遺伝子(neo)からなるキメラ遺伝子を含む。

外植片で1時間DNAをインキュベーションした後、キュベットを氷浴に移した。氷上で10分インキュベーション後、エレクトロポレーションを実施した：375 V/cmの電界強度のパルス1個を900μFコンデンサーから放き出した。エレクトロポレーション装置は、Dekeyserら(1990)の記載と同じものであった(The Plant Cell 2:591)。エレクトロポレーション直後、新しい液体N6gph基質を、キュベット中の外植片に添加し、この後、外植片をさらに氷上で10分間インキュベーションした。

その後、胚を0.2Mマンニトールを補った, Nahli VII基質[100mg/lカゼイン水解物, 6mM プロリン, 0.5g/l NES, 1mg/l 2,4-ジクロロフェノキシ酢酸(2,4-D)並びに0.75g/l NaCl, 及び1.8g/l Phytigel(Sigma Chemical Company, St

Louis, Mo, U.S.A.)で固化した2%蔗糖, pH5.8を補ったN6培地のビタミン並びにマクロ及びミクロエレメント]に移した。系H99及びで3日及び系Pa91で2日後、胚を200mg/lカナマイシンを補った同一基質に移した。約14日後、胚をカナマイシンを補った、マンニトールを含まないNahli VII基質に移した。さらに胚を約2月間、この選択的基質上で維代培養し、約3週間の間隔をあけて維代培養した。誘導した胚形成組織を注意深く単離し、系H99に関しては5mg/l 6-ベンジルアミノプリンを、系Pa91に関しては5mg/l ゼラチンを補ったMS培地[Murashige及びSkoog(1962)Physiol. Plant 15:473]に移した。胚形成組織をこの培地上で約14日間保持し、次いで、系H99に関してはホルモン及び6%蔗糖を含まない、系Pa91に関しては8%蔗糖を含まないMS培地に移した。発育した芽をさらに通常の苗に発育する間、1.5%蔗糖を含む1/2 MS培地に移した。これらの苗を土壤に移し、温室栽培した。

実施例2：実施例1で形質転換したトウモロコシ植物の特徴付け

実施例1からの17本の植物を、ポリメラーゼ鎖反応(PCR)によりキメラneo遺伝子の存在下で分析した。約10～20mg

の組織量に合わせたDelleperteら[(1983)Plant Mol.Biol. Reporter 1:18]により記載されたプロトコルに従ってDNAを調製した。各植物毎に、特定量の組織をミクロファージ管中の抽出緩衝液でふやかした。neo遺伝子のコード配列の一部に対応する708bpフラグメントを、ヌクレオチド1384～1408及び2089～2087(Seq.Id.No.1の番号)のプラスミドpDE108の配列に相補的なオリゴヌクレオチドアローブを使用して、Sambrookら[(1990), 同上]により記載のプロトコルに従ってポリメラーゼ鎖反応で増幅した。アニール温度50℃で全部で35サイクル実施した。最終DNAを、1.5%アガロースゲル上の電気泳動により分析した。708bpフラグメントが全部で13本の植物で同定された。後段で陽性の植物のうち1本が枯死した。

neo遺伝子[即ち、ネオマイシンホスホランスマーカー(NEO)]の発現産物の活性を、以下の如く植物9本で分析した。粗抽出物を、抽出緩衝液[McDonnelら(1987)Plant Molecular Biol. Reporter 5:380]中で植物組織を粉砕することにより調製した。抽出物をReissら[(1984)Gene 30: 211]に記載のプロトコルに従って、非-変性ポリアクリルアミドゲル電気泳動にかけた。NPTII活性を、基質[McDonn

特表平6-502533 (16)

ellら(1987)上述]として [ $\alpha$ - $^{32}$ P]ATPを使用するカナマイシンの *in situ*ホスホリル化により分析した。NPTII活性は、試験した植物の内 8本で知見された(図 1)。

PCR及びNPTIIの両方のアッセイで陽性であることが知見された植物の内 1本(H99-M148-1)をさらに、サザンハイブリダイゼーションにより分析した。ゲノムDNAは、残りのRNAを除去するためにRNaseを用いる処理を補った *Della spora* ら[(1983)上述]に記載のプロトコルに従って植物組織から剪製した。形質転換していないH99植物を対照として使用した。DNAサンプルを以下の制限酵素: BglII, EcoRI, EcoRV, HindIII, BamHI, PvuI, PvuIIまたはPstIで消化し、次いで水平方向アガロース電気泳動にかけた。製造業者(Amersham Hybond-Nリーフレット)により推奨されたように、“Alkali Blotting of DNA”プロトコル及び続くハイブリダイゼーションにより Hybond+(Amersham International PLC, Amersham, United Kingdom)膜へのサザントランスファーを実施した。公開方法[Feinberg及びVogelstein (1983)Anal. Biochem. 132:6]から説明した製造業者により供給されたプロトコルに従って、マルチプライムDNAラベルキット(Amersham)を用いて放射性プローブを調製した。

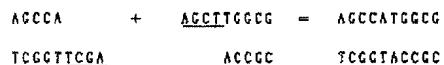
(欠失した塩基には下線を引き、結合部を作り出したNcoI部位を強調した)作り出された。さらなる分析から、HindIII部位の回りでは植物ゲノムをフランкиングするプラスミドDNA配列は、全くまたは殆ど欠失していなかった。他の植物はこの方法では試験しなかったが、PCR及びNPTII分析から、キメラ遺伝子が存在し且つ発現することが知見された。

成熟した形質転換植物は第殖可能であり、且つ表現型的にも全く正常であった。サザンハイブリダイゼーションにより予備分析した植物を、形質転換していない植物(トウモロコシ自家授粉系H99から 2本及びトウモロコシ自家授粉系PaB1から 1本)を用いた 3つの交雑において花粉媒介植物として使用した。全部で 44本のF1子孫の植物を上記記載の如くNPTII活性に満足して分析し、その内の 20本が陽性であることが知見された。これは、通常のメンデルの分離の法則下で予想された 1 : 1 比とは大きく違っておらず、形質転換した花粉媒介植物がキメラ *neo* 遺伝子( $X^2 = 0.38$ )の 1 つの活性コピー(または、あるいは、複数の密接に結合した活性コピー)を持っていたと考えられる。

実験例 3：未成熟な胚の接合体から説明した上型カルスにDNAをエレクトロポレーションすることによる選択的マーカー

プローブとして、もう一つのプラスミドから説明した 1184 bp EcoRI-HindIII フラグメントを使用した。このプラスミドの配列は、Seq.Id.No.2に記載されている。バンドパターン(例えば、図 2 参照)から、少なくともキメラ *neo* 遺伝子は、植物のゲノムDNAに組込まれたことが知見された。

この形質転換した植物(H99-p148-1)の詳細分析から、プラスミド pDE108 の 2 個の殆ど完全なコピー及び 3 番目が転移したコピーの一部を保持していることが知見された。2 個の殆ど完全なコピーは明らかにヘッド～テイルのコンカテマーの植物ゲノムに挿入される。しかしながら、幾つかの転移は、追加の NcoI 部位及び追加の BglII 部位が作り出されるよう起きなければならなかつたが、2 個のコピーの結合部での HindIII 部位(エレクトロポレーション前の pDE108 の直線化に使用した)が欠失していた。植物ゲノムで組込んだように、2 個のプラスミドコピーの結合部のシーケンシングから、HindIII 部位の突出 5' 末端のみが欠失していることが明らかになった。これにより、NcoI 部位は以下のように:



カーネル子を用いるトウモロコシの形質転換

長さ約 0.5~1 mm の未成熟な胚の接合体を、トウモロコシ自家授粉系 PaB1 の発芽種から単離し、次の離代培養までの間隔を約 14 日間として、Mahl VII 基質上で培養した。胚形成組織を発育型(developing type) I カルスから注意深く切削した。最後に EPM 中の胚形成組織(NaCl を含まない EPM-NaCl)を、最大量約 1.5 mm のフラグメントに切断した。得られたカルスフラグメントをこの緩衝液中で 3 時間、予備原形質分離した。3 時間後、カルスフラグメントを EPM-NaCl に移入した。カルスフラグメント約 100~150 mg を、キュベット 1 棚当たり 200 μl EPM-NaCl に移入した。HindIII で直線化したプラスミド pDE108(Seq.Id.No.1)の 20 μg DNA を各キュベットに添加した。DNA を 1 時間カルスフラグメントとインキュベートし、その後、キュベットを氷浴に移した。

氷上で 10 分インキュベーション後、エレクトロポレーションを実施した。375 V/cm の電界強度のパルス 1 回を、900 μF コンデンサーから取り出した。エレクトロポレーション装置は、Dekeyser ら[(1990)上述]の記載と同じものであった。

エレクトロポレーション直後、8 mM アスパラギン、12 mM

## 添付書

プロリン、1mg/l チアミン-HCl、0.5kg/l ニコチン酸、100  
kg/l カゼイン水解物、100kg/l イノシトール、300g/l 蔗  
糖及び54kg/l マンニトールを補った、新しい液体N6aph基  
質をカルスフラグメントに添加し、次いでさらに氷上で10  
分間インキュベートした。

1kg/l 2,4-Dを補った液体N6aph基質中で1日培養後、  
カルスフラグメントを、0.2M マンニトール及び200kg/l  
カナマイシンを補ったMahl VII基質に移した。14日後、カ  
ルスフラグメントを、マンニトールを含まない同一の選択  
基質で離代培養し、次いで約3週間の離代培養間隔を空けて  
約2月この基質でさらに培養した。得られたカルスの胚  
形成区域を、べとべとした組織から単離し、3% 蔗糖及び発  
芽させるために5kg/l ゼラチンを補ったMS基質[Kurashige  
及びSkoog(1962)Physiol. Plant 15:473]に移した。組織を  
この培地上で約2週間保持し、続いて3%または8% 蔗糖を  
含むMS培地に移した。この基質上に発育した芽を、さらに  
通常の苗に発育させるために1.5% 蔗糖を含む半分の強度  
のMS培地に移した。これらの苗を土壌に移し、温室栽培し  
た。

実験例4：実施例3の形質転換したトウモロコシ植物の物

実施例3由来の29本の植物を、ポリメラーゼ鎖反応によ  
りキメラneo遺伝子の存在について分析した。DNAは、約10  
～20ngの組織量を適用するために合わせたDellaPortaら[  
(1983)Plant Mol. Biol. Reporter 1:19]に従って調製した。  
各植物に毎に、特定量の組織をマイクロヒュージ管中の抽出  
緩衝液中にふやかした。neo遺伝子のコード配列の一部  
に対応する708bpフラグメントを、ヌクレオチド1884～1408  
及び2088～2067(Seq. Id. No. 1の番号)のプラスミドpDE108  
の配列に相補的なオリゴヌクレオチドプローブを使用して  
Sambrookら[(1990)上述]に記載のプロトコルに従ったポリ  
メラーゼ鎖反応で増幅した。アニール温度50°Cで全部で35  
サイクル実施した。最終DNAを1.5%アガロースゲル上で電  
気泳動により分析した。708bpフラグメントが全部で14本  
の植物で同定できた。陽性の植物の内1つは後段で枯死し  
た。

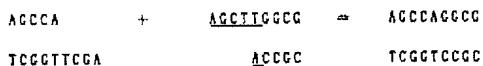
neo遺伝子のNPTII発現産物の活性を、以下のように24本  
の植物で分析した。粗抽出物は、植物組織を抽出緩衝液[  
McDonnellら(1987)Plant Molecular Biol. Reporter 5:380]  
中で粉砕することにより調製した。次いで抽出物をRosaら

[(1984)Gene 30:211]に記載の方法に従って非-変性ポリア  
クリアミドゲル電気泳動にかけた。NPTII活性を、基質  
(McDonnellら, 同上)として [ $\alpha$ - $^{32}$ P]ATPを使用して、カナ  
マイシンのin situホスホリル化により分析した。NPTII活  
性は試験した植物のうち14本で知見された(図3)。NPTII  
陽性であった2本の植物は、PCRアッセイでは陰性であっ  
た。

PCR及びNPTIIアッセイの両方で陽性であったことが知見  
された植物のうち2本(Pa91-M148-2及びPa91-M148-1)を、  
サザンハイブリダイゼーションによりさらに分析した。ゲ  
ノムDNAは、残りのRNAを除去するためにRNaseとの処理を  
補ったDellaPortaら[(1983)上述]に従って植物組織から調  
製した。形質転換していないPa91植物を対照として使用し  
た。DNAサンプルを以下の制限酵素:BglIII, EcoRI, EcoRV,  
HindIII, BamHI, PvuI, PvuIIまたはPstIのうちの1種で  
消化し、次いで水平方向アガロース電気泳動にかけた。製  
造業者(Amersham)により推奨されたように、“Alkali Blot  
ting of DNA”プロトコル及び続くハイブリダイゼーション  
によりErbond+膜へのサザントランスファーを実施した。  
公開方法[Feinberg及びVogelstein(1983)Anal. Biochem. 13

2:6]から説明した製造業者により供給されたプロトコルに  
従って、マルチ-プライムDNAラベルキット(Amersham)を用  
いて放射性プローブを調製した。プローブとして、もう1  
個のプラスミドから説明した1184bp EcoRI-HindIIIフラグ  
メントを使用した。このプラスミドの配列は、Seq. Id. No.  
2に記載されている。バンドパターン(例えば、図4参照)  
から、少なくともキメラneo遺伝子は、植物のゲノムDNAに  
組込まれたことが知見された。

この形質転換した植物(K99-m148-2)のさらなる分析から、  
プラスミドpDE108の2倍の殆ど完全なコピーは、ヘッド～  
テイル配置で保持されていることが知見された。2個のコ  
ピーの結合部でのHindIII部位(エレクトロボレーション前  
のpDE108の直線化に使用した)が欠失していた。植物ゲノ  
ムに組み込んだように、2個のプラスミドコピーの結合部  
のシーケンシングから、HindIII部位の突出5'末端+Hin  
dIII部位の一方の下流の1個の塩基が以下のように：



欠失していることが明らかになった(欠失した塩基には下  
線を引いた)。さらなる分析から、植物ゲノムをフランキ

特表平6-502533 (18)

ングするHindIII部位の回りではプラスミドDNAは、全くまたは殆ど消失していなかった。他の植物はこの方法では試験しなかったが、PCR及びNPTIIアッセイから、キメラ遺伝子が存在し且つ発現することが知見された。

成熟した形質転換植物は繁殖可能であり、且つ表現型的にも完璧に正常であった。ササンハイブリダイゼーションにより予備分析した植物のうち1本を、形質転換していない植物(トウモロコシ自家授粉系899)を用いた交雑に於いて花粉媒介植物として使用した。全部で20本のF1子孫の植物を上記記載の如くNPTII活性に関してアッセイし、その内の6本が陽性であることが知見された。これは、通常のメンデルの分離の法則下で予想された1:1比とは大きく違っておらず、形質転換した花粉媒介植物がキメラneo遺伝子

( $X^2 = 3.2$ )の1個の活性コピーをもっていたと考えられる。

実施例5：未成熟の胚の接合体にDNAを遺伝子エレクトロポレーションすることによる選択不整性遺伝子及び選択可能なマーカーを有するトウモロコシの形質転換

約1～1.5mmの未成熟の胚の接合体を、トウモロコシ自家授粉系899の発育した種から単離した。新しく単離した

胚を酵素的に処理し、実施例1の記載通りに洗浄した。洗浄後、胚をトウモロコシエレクトロポレーション基質液、EPM-KCl(80mM KCl, 5mM CaCl<sub>2</sub>, 10mM HEPES及び0.425M マンニトール, pH7.2)に載置した。200μl EPM-KCl中の約100個の胚を各キュベットに載せた。プラスミドDNA、HindIIIで直線化したpVE107約20μgを各キュベットに添加した。pVE107は、pTTN8の1287bpのEcoRV-EcoRIフラグメント(Ep. 344 029; Seq. Id. No. 3)をプラスミドpDE106(Seq. Id. No. 1)の大きなXbaI(クレノウで充填した)-EcoRIフラグメントに結合することにより得られた8859bpプラスミドである。pVE107は、3553プロモーターの制御下でカナマイシン耐性遺伝子(neo)からなるキメラ遺伝子及びNicotiana tabacumのTA29遺伝子の芽胞-特異的プロモーターの制御下でbarnase遺伝子[Hartley(1988)J. Mol. Biol. 202:913]からなるもう1個のキメラ遺伝子を含む。

barnase遺伝子のフラグメントを含む全ベクター構築は、プラスミドpMc5BSを含むE. coli株MRE609で実施した。pMc5BSは、lacプロモーターの制御下でbarstar遺伝子(barnase阻害剤をコードする)を含む[De Boerら(1988)Proc. Natl. Acad. Sci. USA 80:21]。このプラスミドは、

プラスミドpMT41BのEcoRI-HindIIIフラグメント[Hartley(1988)参照]をプラスミドpMc5-8(DSM 4566)のEcoRI及びHindIII部位にクローニングし、次いでSollazzoら[(1985)Gene 37:199]に通常記載のlooping-out突然変異発生により、phoAシグナル配列の開始コドンで始まり、barstarコード領域の翻訳開始コドンの前の最後のヌクレオチドで終端する配列を除去することにより構築する。

DNAを外植片と1時間インキュベーションした後、キュベットを氷浴に移した。氷上で10分間インキュベーション後、実施例1に記載の如くエレクトロポレーションを実施した。エレクトロポレーション直後、新しい液体NBaph基質をキュベット中の外植片に添加し、この後、外植片を氷上でさらに10分間インキュベートした。

その後、胚を0.2Mマンニトール及び200μg/lカナマイシンを捕ったMahl VII基質に移した。約14日後、胚をマンニトールを含まないが、同一選択剤、カナマイシンを含むMahl VII基質に移した。胚を、約3～4週の維代培養期間で、約2箇月この選択的基質上でさらに維代培養した。誘導した胚形成組織を注意深く単離し、5mg/l 6-ベンジルアミノ

プリンを捕ったHS培地[Murashige及びSkoog(1962)同上]に移した。胚形成組織をこの培地上で約14日間保持し、次いでホルモン及び蔗糖を含まないHS培地に移した。生長した新芽を、通常の苗に生長させるために、1.5%蔗糖を含む1/2 NS培地に移した。これらの苗を土壤に移し、温室で栽培した。

実施例6：実施例5の形質転換した植物の特徴付け

実施例5からの7本の植物、RZM19-2, RZM19-3, RZM19-4, RZM19-5, RZM19-6, RZM19-7及びRZM19-8を、同一胚形成カルス集団から誘導した。これらを拡張ササン分析にかけた。この場合、BamHI-HaeIで消化した植物のゲノムDNAをpVE107及びpTTN8の小さなEcoRV-XbaIフラグメント(PTA29-barnaseを含む; Seq. Id. No. 3参照)でプローブした。総ての植物に於いて、最も強く検出された帯は、予想した1400bpフラグメントであった。しかしながら、これら及び他のササンプロットで知見されたパターンは、非常に複雑で、形質転換によりpVE107の縁でまたは一部が植物のゲノムに多く挿入されたことを示していた。pVE107の挿入されたコピーの幾つかは、明らかに不完全であるか及び/または転位が起きていた。しかしながら、幾つかの複雑な組込みバ

特表平6-502533 (19)

ターンは7本の植物総てに知見された。これは、7本の形質転換体が全て1個の胚形成カルス雑種から誘導されたという事実により説明できた。

形質転換した植物は、不稔性の雄株であったが、これ以外には表現型的にも完全に正常であった。雄株の生殖力は正常であった。雄花の小苞花は、ほとんど正常の長さであったがしかし非常に薄く、空のようであり、全く開かなかつた。詳細な分析から薬は殆ど微細な構造に縮んでいることが知見された。この表現型は、*barnase*遺伝子の少なくとも1個のコピーが発現されただけでなく、薬の組織の一部または全体で選択的に発現したことも示している。

形質転換体RZH19-3は、形質転換していないH99植物からの花粉で授粉し、53本の子孫の苗を回収した。53本の苗の内、32本(60%)は、HPTII陽性であったが、21本(40%)はHPTII陰性であった。F1子孫に於けるこの割合は、通常のメンデルの分離の法則下で予測された1:1比とは大きく離れておらず、形質転換した雄株がキメラ~~neo~~遺伝子( $\chi^2 = 2.28$ )の1個の活性コピーを有していたと仮定できる。HPTII陰性の子孫は生殖力のある雄株であったが、HPTII陽性の子孫は不稔性であった。

242230)；及び*N.tabacum*のTA29遺伝子(EP344028)の芽胞-特異性プロモーターの制御下で、*barnase*遺伝子[Hartley (1988)同上]からなるもう1個のキメラ遺伝子を含む。*bar**nase*遺伝子からなるDNAフラグメントを含む全ベクター構築を、実施例5のプラスミドpMa5BSを含む*E.coli*株HK6で実施した。

DNAを外植片と1時間インキュベーションした後、キュベットを氷浴に移した。氷上で10分インキュベーション後、実施例1に記載の如くエレクトロポレーションを実施した。エレクトロポレーション直後、新しい液体N6aph基質をキュベット中の外植片に添加し、この後、外植片を氷上でさらに10分インキュベートした。

その後、一つのエレクトロポレーション実験からの胚を、0.2Mマンニトール及び2mg/l PPTを補ったMhl VII基質に移した。約14日後、胚をマンニトールを含まない、2mg/l PPTを補ったMhl VII基質(実施例1のMhl VII基質であるが、アロリン及びカゼイントリペプチドを含まない)に移した。約4週間後、胚を、10mg/l PPTを補ったMhl VII基質上でもう1箇月難代培養した。誘導した胚形成組織を注意深く単離し、5mg/l 6-ベンジルアミノブリソニンを補ったMS培地に

HPTII陽性の子孫植物31本を、サザン分析にかけた。これらの植物のうち28本は、これらが誘導された元の形質転換体RZH19-3と同じ組込みパターンを示した。残りの3本の植物は、やや異なるパターンを有していた。

実施例7：DNAの未熟な接合体胚へのエレクトロポレーションによる不稔性の雄の遺伝子及び除草剤耐性遺伝子をもつトウモロコシの形質転換

トウモロコシ近縁自家授粉系H99の接合体の胚を単離し、酵素的に処理し、洗浄し、次いで実施例5に記載の如くエレクトロポレーション緩衝液に置いた。各キュベット毎に200μl EPM-KCl中の約100個の胚を置いた。Biallelicで直鎖化したプラスミドDNA、pVE108約20μgを各キュベットに添加した。pVE108は、PTTM8の1287bp EcoRV-EcoRIフラグメント(EP 344029; Seq. Id. No. 3)をプラスミドpDE110の大きなEcoRI-SstIフラグメント(Seq. Id. No. 4)に結合することにより得られた5620bpプラスミドである。pVE108は、35S3プロモーターの制御下で、ホスフィノトリシンアセチルトランスフェラーゼ(PAT)をコードし、除草剤のグルタミンシンセターゼ阻害剤(例えば、ホスフィノトリシン:PP T)に対する耐性を与える~~bar~~遺伝子を含むキメラ遺伝子(EP

移した。胚形成組織をこの培地上で約14日間保持し、続いて、ホルモン及び蔗糖を含まないMS培地に移した。生長した新芽をさらに通常の苗に生長させるために、1.5%蔗糖を含む1/2 MS培地に移した。これらの苗は、2ℓ/haに相当するBASTA(登録商標：Bayer AG製, Frankfurt am Main, Germany)をin vitroで噴霧しても生存した。次いで、これらの苗を土壌に移し、温室栽培した。この形質転換した苗のうち2本、RZM35-1及びRZM35-1Bをさらに特徴づけた(実施例8参照)。

第2のエレクトロポレーション実験からの胚を、2mg/l PPT及び0.2M マンニトールを補ったMhl VII基質に移した。約14日後、胚を、マンニトールを含まないが2mg/l PPTを補ったMhl VII基質に移した。さらに約3週間後、胚をマンニトールを含まない、10mg/l PPTを補ったMhl VII基質に移した。さらに3週間後、誘導した胚形成組織を注意深く単離し、2mg/l PPT及び5mg/l 6-ベンジルアミノブリソニンを補ったMS培地に移した。胚形成組織をこの培地上で約14日間保持し、続いて、ホルモン、蔗糖またはPPTを含まないMS培地に移した。さらに通常の苗に生長させるために、生長した新芽を1.5% 蔗糖を補った1/2 MS培地に移した。

特表平6-502533 (20)

得られた苗を土壤に移して、温室栽培した。形質転換した苗のうち3本、RZM34-1、RZM34-12及びRZM34-14をさらに特徴つけた(実施例8参照)。

実施例8：実施例7の形質転換したトウモロコシ植物の特徴つけ

実施例7のRZM34-1、RZM34-12、RZM34-14、RZM35-1及びRZM35-18を温室内で生長させた。植物の葉に於ける~~bar~~遺伝子の発現産物の活性を、以下の“PATアッセイ”で分析した。各植物からの葉の組織100mgを、酸で処理した海砂(Merck, Darmstadt, Germany)50mg及びポリビニルホリピロリドン(PVPP)5mgと一緒に、エッペンドルフ管中、抽出緩衝液(25mM Tris-HCl pH7.5, 1mM Na<sub>2</sub>-EDTA:エチレンジアミン四酢酸二ナトリウム塩, 0.15mg/ml フェニルメチルスルホニルフルオリド:PSHF, 0.3mg/ml ジチオトレイトール:DTT及び0.3mg/ml 血清アルブミン)50μl中でガラス棒で粉碎した。抽出物を、マイクロヒュージ管中、16000rpmで5分間遠心分離した。上清を回収し、TE 25/l(25mM Tris-HCl pH7.5, 1mM Na<sub>2</sub>-EDTA)で10倍に希釈した。希釈した抽出物12μlに、1mM PPTのTE 25/l中の1μl、2mM アセチル補酵素AのTE 25/l中の1μl及び[<sup>14</sup>C]アセチル補酵素

A(60mcCi/mmol, 0.02mCi/ml; NEH Research Products, DUPONT, Wilmington, Delaware, USA)2μlに添加した。反応混合物を37°Cで30分インキュベートし、濃縮領域を有するアルミニウムシートシリカゲル60t, I.c.プレート(Herck)にスポットした。上界クロマトグラフィーを、1-プロパンノール及びNH<sub>4</sub>OHの3対2混合物(25% NH<sub>4</sub>OH)で実施した。オートラジオグラフィー(XAR-5 Kodak film)に一晩かけることにより、<sup>14</sup>Cを視覚化した。

除草剤BASTA(登録商標)に対する耐性を、植物1本当たり葉1枚の上面に近い小領域に除草剤1%溶液をはけで塗り、塗った部位及び近隣に於ける損傷兆候を観察することにより試験した。RZM34-1、RZM35-1及びRZM35-18は、全く損傷兆候を示さなかったが、RZM34-12及びRZM34-14は、塗った部位がやや茶色になり、乾燥していた。

RZM34-1、RZM34-12、RZM34-14、RZM35-1及びRZM35-18は、不稔性の雄株であることが判明した。これらの植物の各々の表現型は、実施例6で分析した実施例5の形質転換体に関する記載したものと同一であった。

サザン分析から、RZM35-1及びRZM35-18は、各々のゲノムにプラスミドpVE108の1個のコピーが存在する、同一組

込みパターンを有することが知見された。HindIII部位の近傍のプラスミドDNA配列の小さな部分(エレクトロポレーション前に直線化するために使用した)は、組込みコピーには存在しないようであった。RZM34-1、RZM34-12及びRZM34-14のサザン分析から、これらの植物の各々は、多分そのゲノム中に組込まれたpVE108の一部または全部の2個または3個のコピーを有していることが知見された。このコピーは、コンカチマー配置中に殆ど同様には挿入されない。

形質転換体RZM35-1及びRZM34-1を、形質転換していないH99植物からの花粉で授粉し、子孫の苗を回収した。RZM35-1から回収した苗35本のうち、16本(46%)はPATアッセイで陽性であったが、19本(54%)はPAT陰性であった。F1子孫に於けるこの割合は、キメラ~~bar~~遺伝子( $X^+ = 0.26$ )の1個の活性コピーの通常のメンデルの分離の法則下で予測された1:1比とは大きくずれておらず、形質転換した雌親が、キメラ~~bar~~遺伝子( $X^+ = 0.47$ )の1個の活性コピーま

たは活性であるが、密着結合した複数のコピーを有していると考えられる。

実施例9：乾燥種から精選した胚形成カルスにDNAをエレクトロポレーションすることによる、除草剤耐性遺伝子を有するコメの形質転換

コメ栽培変種植物Nipponbareの皮を剥いた成熟種を、表面滅菌し、0.5mg/l ニコチン酸、0.5mg/l ピリドキシン-HCl、1.0mg/l チアミン-HCl、2.0mg/l 2,4-D、30g/l 蔗糖及び2.0g/l Phytagel, pH5.8を補った固体2N6培地[N6培地(Chuら, 1975, 同上)]に載置し、27°Cで暗所培養した。カルスが3~4週間以内に胚の胚盤から生長した。一次(primary)カルスの胚形成部分を、胚形成カルスに増殖させるために、0.5mg/l ニコチン酸、0.5mg/l ピリドキシン-HCl、1.0mg/l チアミン-HCl、2.0g/l カサミノ酸(Vitamin assay, Difco)、1.0mg/l 2,4-D、0.5mg/l 8-ベンジルアミノアクリン、20g/l 蔗糖、30g/l ソルビトール及び2.0g/l Phytagel, pH5.8を補ったN67培地(N6 培地; Chuら, 1975, 同上)に移した。

継代培養して3~4週間後、胚形成カルスを形質転換実験に使用した。カルスを、最大長さ約1.5~2mmのフラグメ

特表平6-502533 (21)

ントに切り出した。カルス片をEPH中で2回洗浄し、次いで、室温(25°C)で30分から3時間、この緩衝液中で前原形質分離した。次いで、カルスフラグメントをEPH-KClで2回洗浄し、エレクトロボレーションキュベットに移した。各キュベットには、100~200μl EPH-KCl中のカルスフラグメント約150~200μgを載置した。プラスミドDNA、環状pDE110またはHindIII若しくはEcoRIで直線化したpDE110の10~20μgを各キュベットに添加した。pDE110は4083bpプラスミドであり、その全配列はSeq.Id.No.4に記載済みである。このプラスミドは、3553プロモーターの制御下で~~bar~~遺伝子からなるキメラ遺伝子を含んでいる。

DNAを、室温で約1時間カルスフラグメントとインキュベートした。次いで実施例1に記載の如くエレクトロボレーションを実施した。エレクトロボレーション後、カサミノ酸を含まない液体N67培地をカルスフラグメントに添加した。次いでカルスフラグメントを、カサミノ酸を含まないが、5、10または20μg/l PPTを補った固体N67培地に載置し、約4週間、16/8時間の明/暗レジメ下で、27°Cでこの選択培地上で培養した。生長したPPT-耐性カルスを単離し、カサミノ酸を含まないが5μg/l PPTを含む新しいN67培地

上で約2~3週間維持培養した。その後、選択したPPT-耐性カルスを、5μg/l PPTを補った植物再生培地N6M25 [0.5μg/l ニコチン酸、0.5μg/l ピリドキシン-HCl、1.0μg/l チアミン-HCl、288μg/l アスパルチ酸、174μg/l アルギニン、7.0μg/l グリシン、1.0μg/l O-ナフタレン酢酸(NAA)、5.0μg/l カイネチン、20g/l 糖類及び2.0g/l Phytagel]を補ったN6培地(Chuら; 1975, 同上)]に移した。苗を約1箇月生長させ、次いで0.5μg/l ニコチン酸、0.5μg/l ピリドキシン-HCl、1.0μg/l チアミン-HCl、1.0g/l カサミノ酸、20g/l 糖類及び2.0g/l Phytagel、pB5.8を補ったホルモンを含まないN6培地(Chuら, 1975, 同上)に移した。この上でさらに2~3週間保持し、その後、土壤に移して温室栽培した。

上記の2N6、N67、N6M25及びホルモンを含まないN6培地の組成は、Japan Tobacco Inc., Plant Breeding and Genetics Research Laboratory, 700 Misashibara, Toyoda, Isawa, Shizuoka 438, JAPANから提供を受けた。

実施例1.0: 実施例9の形質転換したコメ植物の特徴付け

種々の形質転換実験で得られた実施例9の2本の形質転換したコメ植物を、土壤で4週間栽培し、次いで2t/haに

対応する用量でBASTA(登録商標)を噴霧した。2本の植物はBASTA(登録商標)耐性であり、除草剤処理でも生存したが、形質転換していない対照の植物は、蒸発し、除草剤を噴霧して4日以内に枯死した。

実施例9の2種類の形質転換実験から誘導した2本の植物及び他の4本のin vitro苗を、PvuIIで消化した植物ゲノムDNAをpDE110でプローブしたサザンハイブリダイゼーションにより分析した。この分析から、分析した総ての植物に於いて、pDE110の少なくとも1個のコピーがコメゲノムに組込まれたことが知見された。6本の植物のうち5本に於いて、35S-~~bar~~キメラ遺伝子の殆どを含むpDE110フラグメントに対応する1.0kbフラグメントが、はっきりと同定できた。

実施例1.1: 実施例2及び4の形質転換したトウモロコシ植物を用いる圃場試験

実施例2のトウモロコシ形質転換体H99-M148-1及び実施例4のトウモロコシ形質転換体Pa91-M148-2の子孫を、ベルギー(Afslnee)のPlant Genetic Systems, N.V.実験農場で圃場条件下で試験した。圃場試験は、登録番号BIOT/81/M06でベルギー農業省により許可された。F1、F2及びF3子

孫が、以下の表1に要約されたように交雑から得られた。総ての場合に於いて、親のうち1個はneo遺伝子に属するヘテロ接合体であると考えられる。

各種ロットの内100個以下の種を、長さ5cmの平行な5列に置いた。個々の植物は0.25cm離れており、列間の距離は1cmであった。実験植物の10列の内、対照として形質転換していないH99が1列、形質転換していないPa91植物が1列入っていた。1区画は、対照を含むF1及びF2実験植物からなっていた。これらの区画の各々は、

- i) 1cm縦の道路及び
  - ii) 形質転換していないトウモロコシ植物(Variety Sanior)
  - iii) 3列(1cm離れている)
- により囲まれていた。

実験区画を調製し、種を撒き、次いで以下の表2に記載の計画に従って保持した。種撒きに関しては、植物の穴は、プランツスティックで開け、4~5cmの深さに手で種を入れた。

圃場試験は、実験植物の穂軸(cobs)全体を手で除去し、統一してスチームすることにより終了した。残りの植物は、刈り取り機で機械的に切り刻んだ。

特表平6-502533 (22)

以下の観察を実施した。2～3葉節段階で、発芽した種の総数を各種ロット毎に数えた。以下の表3に見られるように、種ロットP4482で種の42%しか発芽しなかったことを除いては、発芽率は63～100%であった。形質転換していないH99及びPa91植物の種ロットの発芽率は、25～75%であった。

3～4葉節段階で、トランスジェニックneo遺伝子の表現型を以下のようにアッセイした。各植物に於いて、小さなはさみで2枚の葉に葉脈の途中までの切れ目を入れた。次いで切れ目を、4%カナマイシン及び0.2%SDSの水性懸濁液に浸した1片の綿花で拭った。幾つかの植物は、5%カナマイシン及び0.1%SDSの懸濁液で処理した。新しく形成した葉が変色したら、その植物は感受性であり、活性neo遺伝子を欠損していると記載した。新しく形成した葉が正常で脱色していなかったら、その植物は耐性があり、活性neo遺伝子を保持していると記載した。新しく形成した葉の脱色は、拭ってから約10日後に評価した。試験した植物の5～8%は、感受性または耐性であるとはっきりと記載できず、中間の表現型を有していた。これは、最適カナマイシン(及び/またはSDS)濃度以下であること及び試験した

植物の環境条件及び/または生長段階での変動に依存するものと考えた。

後段の分析に於いて、中間の表現型は感受性の植物と一緒にブールした。各交雑または自家授粉に関するカフマイシン耐性植物対カナマイシン感受性植物(中間表現型を含む)の比は、neo遺伝子の1遺伝子座のメンデルの分離の法則を仮定した場合の適応試験のchi-square goodness-of-fit test [Snedecor and Cochran(1967)"Statistical Methods",Iowa State University Press, Ames, Iowa, U.S.A.]により決定した。結果を以下の表3に要約する。

表3のデータから、導入されたneo遺伝子は、自家授粉、戻し交雫または、関連しない系との異系交雫から得られたかに關係なく、3世代にわたって安定であった。分離のパターンは、neo遺伝子の密接に結合した活性コピーをたった1箇または複数有する各々の元の形質転換体及び、通常のメンデルの1遺伝子座の遺伝的性質を有するneo遺伝子形質と一致した。

全ての場合に於いて、実験植物は、形質転換していない对照の植物と比較すると、形態学的に全く正常であった。

表 1

交 雜		種ロット
F1	H99×H99-M148-1	P3186
	Pa91×H99-M148-1	P3189
	H99×Pa91-M146-2	P3162
	Pa91-M146-2の自家授粉	93173(1)
F2	P3189-024×H99	P3051
	P3166-002の自家授粉	P3989
	P3166-012×H99	P3983
	P3166-018×H99	P3982
	P3173-003の自家授粉	P3996
	P3182-017×H99	P4004
	P3162-008×Pa91	P4008
F3	H99×(P3186-005×H99)-001	P4481
	H99×(P3162-004×H99)-011	P4483
	(P3186-001の自家授粉)-003の自家授粉	P4482
	Pa91×(P3169-028×Pa91)-004	P4310
	H99×(P3169-036×H99)-003	P4306

(1) 試験を実施せず

表 2

月 日	活 動	量
1991年 8月29日	土壤の石灰処理	2000kg/ha
1991年 5月23日	NH <sub>4</sub> NO <sub>3</sub> 処理	740kg/ha
1991年 5月23日	過リン酸塩処理	833kg/ha
1991年 5月23日	硫酸カリウム	120kg/ha
1991年 5月27日	F1及びF2 種ロットの種撒き	—
1991年 7月 4日	除草剤処理:	
	Laddok バラフィン油	4 l/ha 105 l/ha
1991年 7月 8日	F3 種ロットの種撒き	—
1991年 7月26日	殺虫剤処理:	
	Fyrimor Ambush	0.285kg/ha 0.183 l/ha
	終 了	—
1991年10月10日		

表 3

	コード	Emerg	%	T	R	I	S	ND	X <sup>2</sup>	信号
F1	P3189	16/20	5	16	5	6	4	1	1.67	n.s.
	P3168	79/100	4	79	36	0	35	8	0.01	n.s.
	P3182	86/100	4	84	47	1	81	3	2.85	n.s.
F2	P3651	65/100	4	62	26	11	16	9	0.02	n.s.
	P3989	91/100	4	83	66	1	10	5	4.71	P<0.05
	P3983	36/40	4	34	17	2	14	1	0.03	n.s.
	P3982	51/60	4	42	20	4	17	1	0.02	n.s.
	P3990	54/60	4	48	32	0	11	5	0.01	n.s.
	P4004	92/100	4	86	38	11	31	6	0.20	n.s.
F3	P4005	20/20	4	18	8	9	3	0	2.00	n.s.
	P4481	72/100	5	88	32	2	30	2	0	n.s.
	P4483	68/100	5	47	22	2	23	0	0.19	n.s.
	P4482	42/100	5	34	30	0	4	0	8.18	n.s.
	P4310	84/100	5	82	50	7	24	1	4.48	p<0.05
	P4308	85/100	5	79	39	1	89	0	0.01	n.s.

コード = 種ロット(表1参照) ; Emerg = 苗木数/撒いた種の数;  
 % = はけ分析で使用した溶液中のカナマイシン%;  
 T = 試験した植物の総数; R = カナマイシン耐性植物数;  
 I = 中間表現型の数; S = カナマイシン感受性植物数;  
 ND = 苗木が生長停止し枯死したため実施できなかった試験植物数  
 X<sup>2</sup> = R対 I + S の分離の法則に関するchi-square値  
 (1) 遺伝子座分離であると仮定した場合  
 開系交雑に於ける予測値は、50% R - 50% I + S;  
 自家授粉に於ける予測値は、75% R - 50% I + S)

## 配列表

## (1) 一般情報:

(i) 出願人: PLANT GENETIC SYSTEM N.V.

(ii) 発明の名称:

単子葉植物を形質転換する方法

(iii) 配列の数: 4

(iv) 連絡先:

(A) 住所: Plant Genetic Systems N.V.

(B) 通り: Plateaustraat 22,

(C) 郵便番号及び市: 9000 Ghent,

(D) 国: ベルギー

(v) コンピューター読取可能形式:

(A) 媒体の種類: 5.25インチディスク, DS, 高密度

1.2 Mb フロッピーディスク

(B) コンピューター: IBM PC/AT

(C) 操作システム: DOS Version 3.3

(D) ソフトウェア: WordPerfect

(vi) 本出願データ:

(vii) 優先権出願データ:

欧洲特許出願番号 91401888.2, 1991年7月8日

欧洲特許出願番号 80403332.1, 1990年11月23日

## (2) 配列番号: 1の情報:

## (i) 配列の特徴:

(A) 型: 核酸

(B) 長さ: 5399bp

(C) 数: 二本鎖

(D) トポロジー: 環状

## (ii) 配列の種類: pDE108:

E.coli 中に複製可能なプラスミドDNA

## (ix) 特徴:

1-451: pUC 誘導配列

452-1284: カリフラワーモザイクウイルス单離物

CabBB-JIから誘導した"35S3"プロモーター配列

1285-2100: ネオマイシンホスホトランスクエラー

ゼ遺伝子のコード配列

2101-3160: Agrobacterium T-DNAオクトビンシ

ターゼ遺伝子から誘導したポリアデニル化部位を含む3'調節配列

3161-5399: pUC18誘導配列

他の情報: プラスミドは E.coli 中で複製可能であり、バクテリアにアンビシン耐性を与える

## (xi) 配列の説明

TCGGCGGTIT	CGGTGATGAC	GGTGAAGAAC	TCTGACACAT	GCAGCTCCCG	50
GAGACGGTCA	CAGCTTGCTT	CTAACGCCAT	GCCGGGAGCA	GACAAGCCCC	100
TCAGCGGGCC	TCAGCGGGTG	TTGGCGGGTC	TGGGGCTGCG	CTTAACATAG	150
CGGCATCAGG	CGCATATTGTA	CTGAGACTGC	ACCATATGCG	GTGTGAAATA	200
CGGCACAGAT	GCCTAAGGG	AAAATACCGG	ATCAGGCCGC	ATTGGCCATT	250
CGGGCTGGCG	AACCTGTTGGG	AAGGGCGGATE	GGTGGGGCGC	TCTTCCTAT	300
TACGGCTGGCT	GGGAAAGGGG	GGATGTTGCTG	CAAGGGGATT	AAGTTGGGTA	350
ACGCCAGGGT	TTTCGCACTG	ACGAGCTGTG	AAAACACCGG	ECAGTGAATT	400
CGAAGCTGGT	ACCGGGGGAT	CTCTAGAGTG	CGACCTGCGAC	GCATGCAAGG	450
TCTCTACCGAG	CAGGCTCTCAT	CAAGACGATC	TACCCGGAGTA	ACAACTTCCA	500
GGAGATCAA	TACCTTCCCA	AGAAGGTTAA	AGATGCACTG	AAAAGATTCA	550
GGACTAACTG	CATCAAGAAC	ACAGAGAAAG	ACATATTTCT	CAAGATCAGA	600
AGTACTTATG	CAGTATGGAC	GATTCAAGGG	TTGCTTCATA	ACCAAGGCA	650
AGTAATAGAG	ATTTGGACTCT	CTAAAAGAGG	AGTTCCTACT	GAATCTAAAG	700
CCATCCATGG	AGTCTTAAGAT	TCAAAATCGAC	GATCTAACAG	AACCTCGCGGT	750
GAAGAGCTGC	GAACAGTTC	TACAGAGCTC	TTTACGACTC	ATAGACAGA	800
AGAAAATCTT	CGTCAACATG	GTGGGACGAC	ACACTCTGGT	CTACTCCAAA	850
AAATGTCAAAG	ATACAGTCTC	AGAAGACCA	AGGGCTTATTG	AGACTTCTCA	900
ACAAAGGATA	ATTTCCGGAA	ACCTCTCGG	ATTCCTATTGC	CCAGCTTATCT	950
GTCACTTCAT	CGAAAGGACA	CTAGAAAAAGG	AAAGGTGGCTC	CTAACAAATGC	1000
CATCATTTGG	ATAAAGGAAA	GGCTATCATTC	CAAGATGCGC	CTGGCGACAG	1050
TGGTCTCCAA	GATCGACCCC	CACCCACAGG	GAGCTCTGGT	GAAAAGAAAG	1100
ACGTTCCAAAC	CAGCTCTTC	AAAGCAAGTGG	ATTTGATGTCG	CATCTCCACT	1150
GACGTAAAGGG	ATGAGCACA	AACCCACATAT	CTTTCGCAAG	ACCTTCTCTC	1200
TATATAAGGA	AGTTCAATTG	ATTTGGAGAG	GACACCTGCA	AATCACCACT	1250
CTCTCTCTAT	AAATCTATCT	CCTCTCTAT	AACCATGGAT	CGGGCAAGG	1300
TAGCTTGGAT	TGAACRAGAT	GGATTCGACG	CGGGTCTCC	GGCGCGCTGG	1350

CTGGAGAGGC	TATTEGGCTA	TGACTGGCA	CAACAGACAA	TGGGTGTC		1400	CCACCGCTGG	TAGGGTGGT	TITTTTGTGTT	GAAAGCAGCA	GATTAGGCC	4150
GTATGGCGG	GTGTTGGGG	TGTCAGLGA	GGGGCGGCCG	GTTCCTTTG		1450	CGCTCAGTGG	AAAGAAAAC	CACGTTAACG	GATTITGGTC	ATGAGATTTA	4200
TCAGAGCCA	CTCTTCCSGT	GCCCTGTA	AACCTGAGGA	CGAGCGACG		1500	AAAAAGGAT	CTTCACCTAG	ATCCTTTAA	ATTTAAAAT	AACCTTTAAA	4250
CGGCTATCCT	GGCTGGCCG	GAACGGGGGT	CTCTGGCG	CTGTCGCGA		1550	TCATCTTAA	GTATATATGA	TTAAACCTG	TCTGACACTG	ACCAATGCTT	4300
CGTGTCACT	GAACGGGGAA	GGGAATGGGT	GCTATTGCCC	GAATGCGGG		1600	AATCACTGAG	GCACCTATCT	CACGGGACTCT	TCTATTTCTG	TCTATCCATAG	4350
GGAGGATCT	CTCTCATCT	CACCTTGCT	GTGCGGAGAA	AGTATCCTAC		1650	TTGCTGACTG	CCCGCTGGT	TGATTAACTA	CGATACGGGA	GGGCCTTACCA	4400
ATTCGTGATG	CAATCGCGG	GCTGCACTAG	CTTGATCGG	CTACGCGCC		1700	TCTGGCCCGA	GTGCTGCA	GATACCGGGA	GACCCAGCGT	CACCGCTCTC	4450
ATTCGACCA	CAAGGAAAC	ATTCGATCGA	GGCAGGACCGT	ACTGGATGG		1750	AGATTTATCA	GCACAA	GGGAAT	GGGGCGGAG	CGCAGAAGTG	4500
AAACCGGTT	TGTCGATCA	GATGATCIGA	ACGAAAGAGCA	TCAGGGGCTC		1800	TCTCTGCAAC	TTCATCGG	TCCATTCAGT	CTTAAATTA	TTGCGGGAA	4550
CCCCAGCGG	AACTGTTGGG	CGGGCTCAAG	GGGGCGATGC	CGGACGCCGA		1850	GCTAGACTAA	GTAGATCGG	AGTAAATGCT	TTCGCGCAAC	TTCTTCGCGAT	4600
GGATCTCGT	GTGACCCAT	GGGATGCTG	CTTGGCGAAT	ATCATGGTGG		1900	TGCTACAGG	ATCGTGTGCT	CACCGCTCGT	GTTCCTGAT	GCTTCATCTA	4650
AAATATGGCCG	CTTTCTGGG	TTCATGACT	GGGGCGGGG	GGGTTGCGG		1950	GGCGGTTG	CCAAAGATA	AGGGGACTTC	GTGATGCC	CAGTTGTTGC	4700
GACCGTATC	AGGACATAGC	GTGTTGCTACC	GTGATGATTC	CTGAGAAGCT		2000	AAAAAGGGG	TTAGCTCTT	CCGCTCCCG	ATCGTGTGTC	GAAGTAAGTT	4750
TGCGGCGGAA	TEGGTGCACC	GTCTTCTCGT	ATTCGGCGTC	ATCCCGCTC		2050	GGCGCCAGGG	ATACGACTA	TGCTTATGGC	ACGACTGCT	AAATCTCTTA	4800
CCGATTCGCA	CGGATCGCC	TTCATCGCC	CTCTTCAGCA	GTCTCTTGA		2100	CCTCATGCC	ATCCGATAGA	TGCTTCTCG	TGACTGCTGA	GTACTCAACC	4850
GGGGGACTCT	GGGTTGCGAA	ATGGGACGAC	AAAGGAGCGG	CAACCTGCCA		2150	AAGTCACTCT	GAGAAATGCT	TATGGGGGGA	CCGACTTGT	CTTGGCCGGC	4900
TCAACGATTT	TEGGTCCAC	CGGGCGCTC	TATGAAAGGT	TGGGCTTGG		2200	TGCAATAGG	GTATAGG	TAATGGGGGA	GGGCGGAA	GGGCGGAA	4950
AATCGTGTGCT	CGGCTCAGGG	GTGTTGATG	CTCTCAGGCC	GGGGATCTCA		2250	GTCAATAGG	GTATAGG	GGGCGGAA	GGGCGGAA	GGGCGGAA	5000
TGCTGGAGCT	CTTCGCCCC	CCCTCTT	AAATGAGATA	GGGAGAGGCC		2300	TGATGGAAA	AGCTTCTGG	GGGGCAAAAC	TCTCACGGG	TTCATGCGC	5050
TATGATGCGA	TTATGGGGG	TTTCATTA	GTGTTGACCO	TGTTGAA		2350	TGAGATCTCA	GTGCTGATG	ACCCACTCT	GCACCCAACT	GATCTTCAGC	5100
CCTGAGCATG	TGTACTCTAG	ATCTTACCG	CGGGTCTGG	TTCATTTAA		2400	ATCTTTAGA	TTCATGAG	TTCCTGGGGT	AGGAAAACA	GGAAAGGAAA	5150
TGAAATATAC	ACCCCTTAC	ATGCTTATT	TATGAAATA	ATTCCTCTT		2450	ATGCGCAAA	AAAGGAAATA	AGGCGACAC	GGAAAGTTTG	AAATCTCTTA	5200
CAATTATCTG	ATGGTACCT	ACTACTATA	TGTCACATA	TAAGTAA		2500	CCTCTCTA	TTGAAATATA	TGAGGCTT	TATCAGGGTT	ATTCCTCTAT	5250
ACAAATATAG	GTGTTGCGAA	GGTTTATGAA	GGTACCTATG	ATAGAGGCC		2550	GAGCGGATAC	ATATGAAAG	GTATTTAA	AAATTAACAA	ATAGGCGGTT	5300
ACATAAACAA	AACTATGGCT	TTTATTTA	AAACCAAT	TTTAAA		2600	GGGGCACATT	TGCGGAAAAA	GTGGCACACT	ACCTCTAAGA	GGGCGGTT	5350
CCCCGAGAAC	CGGTTAACCC	AAAGAACACT	ATTACATAAA	TCTTATCTAA		2650	ATCAAGALAT	AACTATATAA	AAATAGGGGT	ATCACGAGGC	CTTTCGTC	5399
ATTTCAAAAG	GGCCCGAGGG	CTGATCTATA	CGCACACCC	AGGGCGAAC		2700						
TAATAACGTT	GGCTCCAGG	AACTCCGGG	CCCCGGGGG	CTTGGGGTGT		2750						
GAGATCTCTT	GAAGTTGAGT	ATGGGGCGT	CCCTCTACCC	AAAGTATGCG		2800						
GGACCATTC	ACCCGGTCA	GGCAGGGCG	CGGGTAAACCC	ACTTGTGTC		2850						
CGGAGAATTA	TGCGACATT	TTTGGGTTA	TGTTGGGCC	AAATGAACTG		2900						
CAGGTCAAC	CTTGACAGTG	ACGCAAACT	GTGGGGCGG	TCCAGGGGGA		2950						
ATTCGGCGG	AAACATCTGGA	GGCTCAGCA	GGGGCTCGAT	CCCTCGCGAG		3000						
TGCGCTCTG	TGCGCTCTGA	GGGCTGGGAA	CTTGTGCGG	TCTTACCGGC		3050						
AGCGGAAATTC	CGTCGCACT	CGGGGGCTGG	CGGGGGCTGA	TCTTACCGGC		3100						
CATGCCCCCG	AACTTGAGGA	GTGGGGGGG	ACGGATGGGG	CTTGGTGTGA		3150						
CCTGAGCGGA	AGCTTGGCT	AAATCATGTC	ATAGCTGTT	CTTGTGTTGA		3200						
ATGTTATCTC	ACACAAATTC	ACACACAAAC	TACGAGGCCG	AAAGCATAAAG		3250						
TGTAAGGCT	GGGGTGCTPA	ATGAGTGGAG	TAACTCTACAT	TAATTTGCTT		3300						
GGGCTCACTC	CCGGTTTTC	AGTGGGGAAA	CTCTGTGTCG	CGAGTCGCAAT		3350						
ATGAGATCTG	CGACGGCGG	GGGGAGGGG	GTGTCGCGAT	TGGGGCTCTT		3400						
TCGGCTTCCC	CGGCTCAGTG	TCGCGTGTG	GGGGGGGGG	GGGGGGGGG		3450						
ACCGGATATCA	GTGCTACTCA	AGGGGGPAAT	ACGGTTATTC	ACAGAACTAG		3500						
GGGATAACGG	AGGAAAGAAC	ATGAGGACAA	AAAGGCGAGG	AAAGGCGAGG		3550						
ACCGGAAATAC	GGGGGGGGT	GTGCGGTTT	TTTCATTTGG	TTGGGGGGCC		3600						
TGACGGAGCAT	CAACAAATTC	GACGTCIAAG	TCAGAGGTTG	CGGAGGGGGA		3650						
CAGGACTATA	AAAGTACCCAG	GGGTTTCCC	CTGGGAGGTC	CCCTGGCGCC		3700						
TCTCCCTGTT	CGGCTACCC	GCTTACCGG	TACCTGTGCG	CCTTTGTGCG		3750						
TTCGGGAAAGC	GTGCGCTTT	TTCAGATGTC	ACGGCTGAGG	TAATCACTG		3800						
CGGTGTAAGT	CGTTCGGCTC	AAACGIGGGCT	GTGIGLGA	AAACGGGCTT		3850						
CAGCCGACCC	GTGTCGGCTT	ATTCGGTAC	TAATGCTCTG	ATGCTGAAAGC		3900						
GTAAAGGACAC	GAATATATCGC	CACTGGCAGC	AGGCAACTGG	AAACGAGATA		3950						
GCAGACGGAG	GTATGTTAGGC	GTGTCGACG	AGGCACTGGT	AAACGAGATA		4000						
AACTACGGGT	ACACTAGAAG	GACAGTATT	GGTATCTGGG	CTCTGCTGAA		4050						
GGCCAGTTTAC	TTTCGGGAAA	GAGTGGTAG	CTCTGATCC	GGGAAACAAA		4100						

(3)配列番号：2の情報：

(i)配列の特徴：

(A)型：核酸

(B)長さ：1186bp

(C)鎖の数：二本鎖

(D)トポロジー：直鎖

(ii)配列の種類：neo遺伝子に対するプローブとして使用したDNA:

(ix)特徴：

1-8: Nicotiana tabacumの芽胞特異的プロ

モーターから誘導した配列

9-780: ネオマイシンホスホランスフェラーゼ遺伝子のコード配列

791-終: Agrobacterium T-DNA遺伝子7から誘導したポリアデニル化部位を含む3'調節配列

(xi)配列の説明

AAGCTTGGAT	GGATTTGACG	CAGGGTCTCC	GGCCGCTTGG	GTGGAGAGGC	50
TATTCGGCTA	TGAGCGGCA	CAACAGACAA	TGCGCTGCTC	TGATGCGGCC	100
GTGTTCCGGC	TGTCAGGCC	GGGGGCGCCCG	GTTCCTTCTTG	TCAAGACCGA	150
CCTGTCGGGT	GGCTCTGAT	AACTGGAGGA	GGGGGCGCCCG	CGGGTATCTGT	200
GGCTGCGGT	GGCTCTGAT	AACTGGAGGA	GGGGGCGCCCG	CGGGTATCTGT	250
GAAGCGGGAA	GAAGCGGGCTT	CTCTGGCGAC	CTGTTGCTCGA	CGTGTGCACT	300
CTCTGATCTC	CACTCTCTAC	CTGCTGGCG	AGTATTCCTAC	ATGGCTGATG	350
CAATGGGGCG	GTGCTGATC	ACCTGGATG	GGGGGGCTCC	ATTCGACAC	400
CAAGCGGAAC	ATTCGATGCG	ACCAAGAGGA	TCAGGGGCTC	GGGCCAGGCC	450
TGTCGATCG	GATGATGATC	TATGAAAGGT	TGGGGCTTGG	AAATCTTTC	500
AACTGTTGCG	CAGGGGCGAC	GGGGGGCTAC	GGGAGGGGGA	GGATCTCTC	550
GTGAGCTTAC	GGGAGGGGAA	ATTCAGGGGAT	ATCAAGGGT	AAATAGGGCC	600
CTTTCGAGCT	CTGGGGCGGT	GGGGGGGGGG	GGGGGGGGGG	GACCCCTATC	650
AGGACATAGG	GTGGCTGACG	GGGGGGGGGG	GGGGGGGGGG	TGGGGGGGGAA	700
TGGGGTGAACC	GTGTCCTGAT	GGGGGGGGGG	GGGGGGGGGG	CGGATTCGCGA	750
GGCGATGGCC	TTCTATGGG	TTCTATGGG	TTCTATGGG	GGGGGACTCT	800
GGGGTTGGAA	ATGAGCCGAC	AAAGGAGGCC	AAACCTGCGA	TCAAGAGATT	850
TCGATTCGAC	CGGGCGCTTC	TATGAAAGGT	TGGGGCTTGG	AAATCTTTC	900
GGGGACCGCC	GTGTTGGATGT	UCTCGACGGC	GGGGGGCTAC	TGCTGGAGTT	950
CTTCGGCCAC	CCCGGATCCAT	GAGGTAAGGT	AGCTTATCTA	TCAAATTATG	1000
TATTACACAT	AAATATGGAC	TCGATCTTCTG	ATCTACGGCA	ATGTCACAGC	1050
ATGATTAATC	AGTATTTGGA	ATATTTCTGA	ATTTAAACTA	GCATCAATAA	1100
ATTTATGTT	TGCTGTTGAC	TATATACACT	GACTGTTAT	TTTATCAATA	1150
ATATTTAAA	CTATATTTCT	TTCAGAGTGG	GAATTC		1186

(4) 配列番号：3の情報：

(i) 配列の特徴：

(A) 型：核酸

(B) 長さ：1287bp

(C) 鎮の数：二本鎮

(D) トポロジー：直鎮

(ii) 配列の種類：キメラ遺伝子を含むDNA

(ix) 特徴：

1-545: Nicotiana tabacumからのTA29遺伝子  
からのプロモーター546-881: barnase遺伝子のコード配列882-: Agrobacterium T-DNAからのノバリン  
シンターゼ遺伝子から誘導したポリア  
デニル化部位を含む3'調節配列

ATCTAGCTAA	GTATAAATCGG	ATTAATTGCA	TTAACACAGT	GAATATAGTG	50
CGAACACAGA	AGGGACAAATT	GACTTGTCA	TTTATGAAAG	ATGATTCAA	100
CATGATTTTA	TATGACTTAA	TATATCATC	CTACTCGAAAT	TAAAGCGACA	150
TAGGCTCGAA	GTATGCCAAT	TTGACAAATG	AAATTTAAATC	AGTTTTGAA	200
TGAACTTAA	AGGAGACTTG	TGAACTGTGG	GTGGCTGGAC	TAGAATAAAC	250
ATCTCTCTA	GCACAGCTTC	ATAATGAAAT	TTCCCATAACT	GAATATCGGG	300
TGAGACAAAT	TTTTCGTAATC	TTTTCCTCAC	ACTAAAGTCA	TGTTTGCAAC	350
AAATTAATAC	AGGAAACGTC	AATGTTACCC	TCAGATAGTC	CTGCTACTCC	400
CCATTTCCT	CGGAAATGTC	CAACAAAGT	TAGTTTGGCA	AGTGTGTTGT	450
TATGCTTGT	GTGCTATATA	TCGCCCTTGTG	GTGCAAGTGT	AACAGTACAA	500
CATCATCACT	CAAAATCAAG	TTTTTACTTG	AAGAAATTAG	CTTACCATGGT	550
ACGGTTATTC	AACGGCTTTC	ACGGCGTTGC	GGATTTATCTT	CAGACATATC	600
ATAAGTACAC	TGATTAATTC	ATTACAAAT	CACAAACGACA	AGCCCTCGGC	650
TGGGTTGGAT	CGAAATGGAA	CTTGTGACAC	GTGCGCTCCG	GGAAAAGCAT	700
CGGGGGGGAT	ATGTTTCAAA	ACAGGGAAAG	CAAACTCCCG	GGCAAAAAGCG	750
GACGAAATG	GGGTGAAGCC	GATAATTAAT	ATACATCAGG	CTTCAGAAAAT	800
TCAGACCGGA	TTCTTATCTC	AAGCAGCTTG	CTGATTAAAC	AAACAACCGA	850
CCATTTACAA	ACCTTTACAA	AATATCACATA	AGGAAAAAAA	CGCCCTCCCT	900
CGGAGGCGGT	TTTTTACGG	TTTACATCAA	GTCTGAAATA	AATTTTTCTT	950
CAAACTCTGA	TGCGCTTCA	TCATCTTCC	GXXXXCTCTA	GAGGATCCGA	1000
ACGAGATCGT	TCAACATTT	GGGAAATGAT	TTCCTTAAAG	TTCIATCTCG	1050
TIGCCGGCTT	TGCGTGTAT	ATGATTTAT	TTCTGTTGAA	TTACGTTAAG	1100
CATGTAATAA	TTAACATGTA	ATGGCATGAC	TTATTTATGAA	GATGCGTTTT	1150
TATGATTAGA	GTCCCCGAAT	TTAACATTTA	ATACGGGATA	GAAMACAAA	1200
TATAGGGCGC	AAACTAGGAT	AAATTTATGCG	GGCGCTGTG	ATCTATGTTA	1250
CTAGATCGGG	AAAGATCCCGG	GGTACCGGAG	TCGAATT	1287	

(xi) 配列の説明

(5) 配列番号：4の情報：

あり、バクテリアに対するアンビシリ

(i) 配列の特徴：

(A) 型：核酸

(B) 長さ：4883bp

(C) 鎮の数：二本鎮

(D) トポロジー：環状

(ii) 配列の種類：pDE110:

E.coli中で複製可能なプラスミドDNA

(ix) 特徴：

1-895: pUC18誘導配列

396-1779: カリフラワーモザイクウイルス単離物  
Cabb-B-J1から誘導した"35S3"プロモ  
ター配列1780-2331: ホスフィノトリシニアセチルトランス  
フェラーゼ遺伝子のコード配列2332-2819: Agrobacterium T-DNAノバリンシンタ  
ーゼ遺伝子から誘導したポリアデニル  
化部位を含む3'調節配列

2620-4883: pUC誘導配列

他の情報：プラスミドはE.coli中で複製可能で

(xi) 配列の説明

TCCCGCGTTT	CGGTGATGAC	GGTCGAAAACC	TCTGACACAT	GCAGCTCCCG	50
GAGACCGTCA	CAGCTTGTCT	GTAAAGCGAT	GGCCGGGAGCA	GACAGCCCG	100
TGAGGGCGG	TCACGGGGTG	TCGGGGCTGG	CTTAACATATG	150	
CCGCATCAGA	GCACATGTA	CTGAGAGTGC	ACCCATATGG	GTGCAAAATA	200
CCGCACAGAT	GGCTTAAGGAC	AAAATACGGC	ATCAGGCGCC	ATTGCGCATT	250
CAGGCTTGGG	AACCTTGGG	AAAGGGCGATC	GGTGCCTGGCC	TCTTCGCTAT	300
TACGCCAGGT	GGCGAAAGGG	GGATGTGTC	CAAGGGCATT	AAGTTGGGTA	350
ACGCCAGGGT	TTTCCCGAGTC	ACGAGCTTGTG	AAAACGACCG	CCAGTGAAATT	400
CCATTCGCCAC	CAAAACCTGA	ACCTTGGCAGT	TCAGTTGTC	CTTCAGAGAGA	450
CGAAATGGGGT	ATTCACACCC	CTTCACACCA	CTACTACGTG	GTGATAAACG	500
GACCTGATGTC	GGGTATATAC	GATGACTGGG	GTGTTACAAA	GGCACGCAACA	550
AACGGCTGTTG	GGGGAGTTGG	GCATTAAGAA	TTTGCACATA	TTACAGAGGC	600
AAAGGAGGAGA	GCTGAAACCGG	ATACACACAG	TCGACAAACA	GATAAGGTGA	650
ACTTCATGCC	CAAAAGGAGAA	GTCACATTC	AGCCCAGAG	CTTTCGGAAG	700
GCCTTAACCA	GGCCACCAAAA	GGAAAAAGCC	CACTGTCAC	CTAGGGAAAC	750
AAAAGGCCCA	GCACGTTAC	AGCCCGAAA	GAGATCTCT	TTGGCCCCGGA	800
GATTAAATG	GGCGATTTTC	TCTATCTTAA	CGATCTAGGA	AGGAAGTCTG	850
AAGGGTAAGG	TGACGGACACT	ATGTTGACCA	CTGATAATGA	GAAGGTAGC	900
CTCTTCATTG	TCAAGAAAGA	TCTGACACCA	CAGATGTTTA	GAGGGCTTA	950
CGGAGCAGGT	CTCATCAGA	GGATCTACCA	GACTAACAT	CTCCAGGAGA	1000
TCAAATACCT	TCCCAAGAAG	GTAAAGATC	CACTTCAAAG	ATTCAAGACT	1050
AATTCGATCA	AGAACACAGA	GAAGACATA	TTTCTCAAGA	TCACAAAGTAC	1100
TATTCGAGTA	TGGGAGATTG	AGGGCTTGT	TCATAAAACCA	AGGCAAGTAA	1150
TAGAGGATGG	AGTCTCTAA	AAAGGTAGTC	CTACTGAAATC	TAAGGCCATG	1200
CATGGAGTCT	AGGATCTAAA	TCGAGGAACT	ACAGAGACTC	GGCGTGAACA	1250
CTGGCCGAA	GTTCATACAG	AGTCTTTAC	GACTCAATAC	CAAGAAGAAA	1300

特表平6-502533 (26)

ATCTTCGTCACATGGTGGAGCACGACACTCTGGTCTACTCCAAAAATGT	1350	CCCTCTCATCAGCTTATTGTTGCGCGAAGAGTAGAATAAGTAGTT	4100
CAAAAGATACA GTCTCAGAACG ACCAAAGGCC TATTGAGACTT TTTCACACAA	1400	CSCCAGTTAACAGCTTGCG AACGTGTTTCACATTGCTAC AGGCATCGTG	4150
GGTAATTTTC GGGAAAAGCTC CTGGGATTC ATTGCCCGAC TATCTGTGCA	1450	GTCACGCTCGTGTGCTTCA TTACGCTTCG GTCAGCTCCG	4200
TTCATCGAAA GGCACTAGA AAAAGGAAGGT GGCTCTTACA ATGCCCATCA	1500	ATCAAGGCGA GTTACATGAT CCCCCATGTT GTCCAAAAGAA GCGGTTAGCT	4250
TTGGGATAAA GGAAAGGCTA TCATTCAGA TGCTCTGCG GACACTGGTC	1550	CCTCTGGCTTACCGCTT GTCAGACTA AGTGGCCCG AGTGTATTC	4300
CCAAAGATGG ACCCCCACCA ACAGGAGGAGA TGCTGAGAAA AGAACGCTT	1600	CTCATGCTTAA TGCGGAGACT GCATAATTCCTTACTGTC TGCCATCGGT	4350
CCARACACGT CTTCACAGCA AGTGGATTGA TGTCGACATCT CCACATGAGCT	1650	AAGATGCTT TTCTGACTGTGAGACTAC AACCAGTCATC TTCTGAGAAT	4400
AAGGGATGAC GCACATTCG ACTATCTTCG ACGAACGACCT TCCCTATAT	1700	AGTGTATGCG GCGGACGAGTG TGCTCTGCG CGGGCTCAAT AGGGGAAAT	4450
AGGGAACTTC ATTTCATTTG CAGACGACAC GCTGAATCTC CCAGCTCTC	1750	ACGGGCCCCAC ATAGCAGAAC TTAAAGTCATCCTCATCATG GAAAACCTTC	4500
TCTATAATTC TATCTCTCAG TCTATAACCA TGGAACCCAGA ACCAGCCCG	1800	TTGGGGGCGA AAACCTCTCAA GGATCTTACG GCTGTTGAGA TCCAGITCGA	4550
GGCGACATCC CGCGTGCACCG CGAGGCGGAC ATGCCCGGGG TCTGCACCAT	1850	TGTAAACCAAC TCGTGACCC AACGTATCTT CAGCATCTT TACTTCACC	4600
CGTCACACCG TACATCGAGA CAAGACGCTT CAACCTGGCG	1900	AGGTTTCTG GGTAAGCAAA AACAGGAAGT CAAATGCGG CAAAAGAGG	4650
AGGAACCCCA GGATGGGAGA GACACCTCG TCCGCTGCG GGAGGCTAT	1950	ATAAAGGGGACACGGAAT GTTGAATACT CATACTCTTC TTCTTCAAT	4700
CCCTGGCGCG CGCCGGCGAG TGCGGCGATG GGACGGGGCGG TGCGCTAACG	2000	ATTATGAGAATTTTACG GGTTATGTC TGATGAGCGG ATACATATTT	4750
GGGGCGCTGG AAGGACCCCA ACGGCTACCA CTGGACGGCG GAGTCGAGCG	2050	GATGTATTAGAAGAAAATAA ACAAAATGGG GTTCCCGCGA CATTTCCCCG	4800
TGTCGACCTG CCGGGGGGGG GAGGGGAGG GACTGGGCTG CAGCTCTAC	2100	AAAGTGGCCA CCTGACCTCT AAGAAACCAT TATTATCATG ACATTAACCT	4850
ACGGACCTTC CGAAGCTCCG GAGGGGAGCAG GGTCTCAAGA GCGTGTGCG	2150	ATAAAATATAG GCGTATACAG AGGCCCTTTC GTC	4883
TGTCACTGG CGTGGCCAAAGC ACCGGAGCGATG GCGCTGCGAC GAGCGCTCTC	2200		
GATATGCCCG CCCCGGCGATG CTGGGGGCGG CGGGCTTCAA GCAAGGGAAC	2250		
TGGCATGAC CGGGTTTCTG GCGATGCGGAT TTTCAGCTGC CGCTCTGGCG	2300		
CGGGTGGGTC CTGGGGCGCA CGGAGATCTG ATCTCAACCGC TCTAGGATCC	2350		
GAAGGAGATGAC GCAACACAT TTGCGCATTA AGTGTCTTAA GATGAACTCC	2400		
TGTCGCGGT CTGGGATTCG TATCTCATATA ATTCTCTGTT AATTCGGTTA	2450		
AGCATGATAT AATTAACATG GATTCGATG CTTTGTATPAT GAGATGGGTT	2500		
TTTATGATTA GATTCGATG AATTAACATG TTATCTGCGA TAGAAAGCA	2550		
AAATGAGTCG GAACTATGG ATTAATGGT GGGGGGGCTG TCTATCTATG	2600		
TACTGATGCG GAGAGATCTC CTACAGCTGA CTCTGAGCGA TGCAAGCTTG	2650		
GGGTAAATCAT GGTGATGCG CTGTTCTGTC TGAAATGTTG GCGTGTCTAC	2700		
AATTCACACG AACATACGAG CGGGAGGCGAT AAAGGTAAAGA GCTCTGGGNG	2750		
CCTAAATGAGT GAGATGCTG ACAGTAATGG CGTGGCGCTG ATCTGGGGCT	2800		
TTCCAGGGGG GAGCTCTGCG CTGGGGCGT CATTAACTGAA TCGGCAACG	2850		
CGGGGGGGG GGGGGTGGG GATTTGGGGC CTCTCTGGCT TCGGCTCTCA	2900		
CTGAGCGCC CGCGGGCGC CTGGGGCTG CGGGGGCGGT ATCAGCTCTAC	2950		
TCATAGGGGG TAATAGGGGT ATTCACACAGA TGCGGGGATA AGCGGGAAA	3000		
GAACAGCTGA GAAAAGGCC AGCAAAAGGC CGAAGAACCTT AAAAGGGCGG	3050		
CGTCATGCGC TTTCCTTCAT AGGGCTGGG CGGGCTGCGA GCTCATACAAA	3100		
ATTCGACCGC GAAGTCAGAG CTGGCGGAAAC CGCAACGGAC TATAAAAGATA	3150		
CGAGGGCGTTT CCCCTGGAA GCTGCTCTGT CGGCTTCTCT GTCGCGACCC	3200		
TGCGGCTTAC CGGATACCTG CTGGGCTTTC TGCTCTGGG AAGGGTGGCG	3250		
CTTTCATGATG GCTCACGGTG TAGGTATCTG AGTGTGGTGT AGGTCTGTTG	3300		
CTTCGACGGT GGGGGGGGGTGGC AGCAAAACCCG CGGTCAGGCC CGGGCTGGCG	3350		
CCTTATCCG TAATATATCGT CTGGAGTCC ACCGGGTAAG ACACGACITA	3400		
TCCGCACTGG CAGGAGGCCAC TGTTAACAGG ATTAGCAGAG CGAGGTATGT	3450		
AGGGGGTGTG ACAGAGTCTC TGAGTGGT GCTTAACATC GGTAACTA	3500		
GAAGGACAGT ATTTCGATTC TGCGCTCTG TGAAAGCTGACT TACCTTCTGGA	3550		
AAAGAGATG TGAGCTTTCG ATTCGGGCAAAC CAAACCCACCG TGGTAGCGG	3600		
TGGTTTTTGTG GTTGGCAAGG AGCAAGATTAC GCGCAGAAAAA AAAGGATCTC	3650		
AAGAAGATCC TTGATCTTCTG TCAACGGGGT CTGACGCTCA TGGAACGAA	3700		
AACTCACGTT AGGGGATTTCG GCTCATGAGA TTATCAAAA CGATCTCAC	3750		
CTAGATCTT TTAAATTTAA AATGAAGGTT TAATCAATC TAAAGTATAT	3800		
ATGAGTAAAC TTGGTCTGAC AGTCAACAT GCTTAACTG TGAGGACCT	3850		
ATCTCAGCGA TTCTCTCATTC TGCTTCACTC ATAGTTCCCT GACTCTCCGT	3900		
CCTGTAGATA ACTACGATAC GGAGGGCGT ACCATCTGGC CCCAGTGTG	3950		
CAATGATACC GGAGAACCCA CGGTCAACCGG CTCAAGATTT ATCACGAAATA	4000		
ACCGAGCCAG CGGGAGGGGC CGAGCGCAGA AGTGGTCTG CAATTTTATC	4050		

FIG. 1

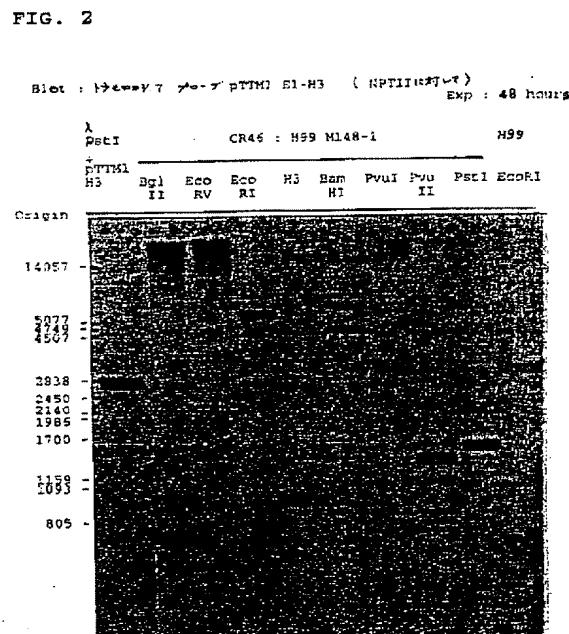
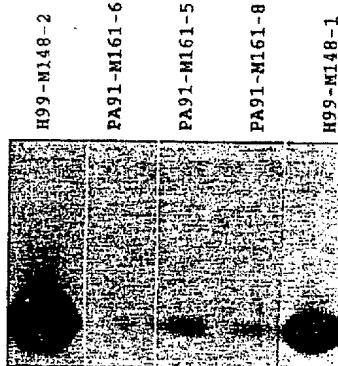


FIG. 3

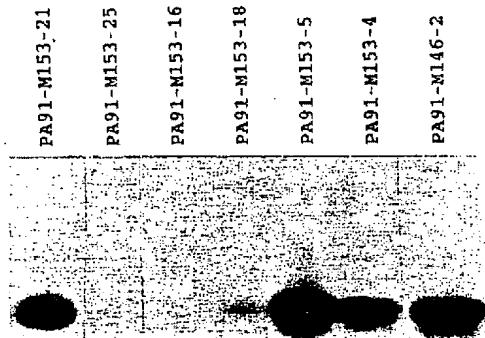
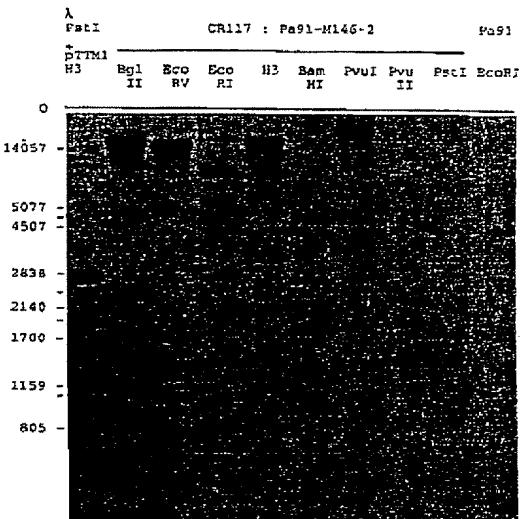


FIG. 4

Blot :  $\lambda$  EcoRI + PTTM1 H1-H3 ( NPTEL #71c )  
Exp : 48 hours



International Application No. PCT/EP 91/02198		
1. CLASSIFICATION OF SUBJECT MATTER (If several classifications apply, indicate all) According to International Patent Classification (IPC) or to its National Classification and IPC Int.Cl. 5 C12N15/82; A01H5/00; C12N5/10		
2. FIELDS SEARCHED  Mistakes Documented Search Classification System      Classification System		
Int.Cl. 5	C12N ; A01H	
Information disclosed after the Date of International Publication to the Extent that such Documents are included in the Fields Searched		
3. DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT  Category *      Citation of Document, if two references, means appropriate, or the relevant passage(s)      Relationship to Claim(s)		
X	HL,A,B 801 444 (SOLVAY) 2 January 1990 see page 6, line 24 - page 7, line 20 see page 7, line 36 - page 12, line 16	1,3,4, B-16
X	EP,A,0 334 539 (ICI) 27 September 1989 see page 2, column 2, line 15 - line 36 see example 1	1,9-18
X	EP,A,0 290 395 (SANDOZ) 9 November 1988 see page 3, line 29 - line 41 see example 5	1,4,B-16 17,18
X	WO,A,8 809 374 (MAX PLANCK GESELLSCHAFT) 1 December 1988 see page 8, line 10 - page 9, line 37	1,9 -/-
<small>* 2 part reference of cited document(s); ** document containing the general state of the art which, in our opinion, is not yet relevant; *** earlier documents published at or after the International Filing date **** which may serve merely as a point of attack or which is used to establish the publication date of another document ***** document referring to the priority date of another document ***** document published prior to the International filing date but later than the priority date thereof ***** document capable of the same general effect</small>		
4. CERTIFICATION		
Date of the Actual Completion of the International Search 18 FEBRUARY 1992	Date of Filing of the International Search Report 12 FEBRUARY 1992	
International Searching Authority EUROPEAN PATENT OFFICE	Signature of International Examiner HADDOX A.D.	

International Application No. PCT/EP 91/02198	
5. DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT (CONTINUED FROM THE SECOND SHEET)	
Category*	Citation of Document, if two references, means appropriate, or the relevant passage Relationship to Claim(s)
Y	EP,A,0 344 029 (PLANT GENETIC SYSTEMS) 29 November 1985 see claim 12 -----
P,X	DE,A,4 013 099 (HOECHST) 31 October 1991 see page 4, line 19 - line 29 -----
A	THE PLANT CELL vol. 2, no. 7, July 1990, ROCKVILLE, MD, USA. pages 591 - 602; DEKEYSER, R. A., ET AL.; "Transient gene expression in intact and regenerated rice tissues" see page 600, left column, paragraph 2 -----
A	EP,A,0 203 730 (UNIVERSITY OF NOTTINGHAM) 3 December 1986 see claims 1-10 -----
A	DE,A,3 738 874 (INSTITUT BOTANIKI UKRAINSKOJ) 17 November 1988 see example 5 -----

## 国際調査報告

EP 9102198  
SA 53248

This search lists the patent family members relating to the patent documents cited in the above-mentioned International search report.  
 The members are as contained in the European Patent Office EPO file.  
 The European Patent Office is in no way liable for those particulars which are merely given for the purpose of information. 18/02/92.

Patent document cited in search report	Patentation date	Patent family member(s)	Patentation date
NL-A-8801444	02-01-90	None	
EP-A-0334539	27-09-89	AU-A- 3157389 JP-A- 2009378	21-09-88 12-01-90
EP-A-0290395	09-11-88	AU-B- 613905 AU-A- 1550888 JP-A- 63301792	17-10-88 10-11-88 08-12-88
WO-A-8809374	01-12-88	EP-A- 0388244 JP- 2503623	11-04-90 01-11-90
EP-A-0344029	29-11-89	AU-A- 3537189 WO-A- 8910396 JP-T- 2501988	24-11-89 02-11-89 22-11-90
DE-A-4013099	31-10-91	FR-A- 2661421	31-10-91
EP-A-0203790	03-12-88	GB-A, B 2175919 JP-A- 61285931	10-12-85 16-12-86
DE-A-3738874	17-11-88	None	

For more details about this report : see Official Journal of the European Patent Office, No. 12/82

## フロントページの続き

(81)指定国 EP(AT, BE, CH, DE,  
 DK, ES, FR, GB, GR, IT, LU, NL, SE), OA(BF, BJ, CF, CG, CI, CM, GA,  
 GN, ML, MR, SN, TD, TG), AU, BB,  
 BG, BR, CA, CS, FI, HU, JP, KP,  
 KR, LK, MC, MG, MN, MW, NO, RO, SD, SU, US